

博士論文（要約）

チロシンモチーフを利用した
抗体・受容体キメラによる
シグナル伝達蛋白質の活性制御

坂 晃一郎

目次

1. 研究背景.....	1
1.1 シグナル伝達の研究について.....	1
1.2 サイトカイン・シグナル伝達経路について.....	1
1.3 サイトカイン受容体のシグナル伝達メカニズムについて.....	2
1.4 キメラ受容体研究について.....	3
1.5 抗体について.....	5
1.6 チロシンモチーフの研究について.....	6
1.7 再生医療・遺伝子治療について.....	9
1.8 造血幹細胞について.....	9
1.9 造血幹細胞の自己複製について.....	10
1.10 造血細胞を用いた遺伝子治療について.....	11
1.11 造血幹細胞の体外増幅について.....	11
1.12 研究概念について.....	12
1.13 略語.....	15
2. トップダウン型モチーフエンジニアリングによるキメラ受容体の活性制御	17
3. ボトムアップ型モチーフエンジニアリングによるキメラ受容体の活性制御	18
3.1 研究背景.....	18
3.2 実験方法.....	18
3.3 実験結果.....	20
3.4 考察.....	25
4. 異なるチロシンモチーフを利用したキメラ受容体による複数のシグナル伝 達蛋白質の同時活性化.....	28
4.1 研究背景.....	28

4.2 実験方法.....	28
4.3 実験結果.....	31
4.4 考察.....	42
5. 複数のチロシンモチーフを利用したキメラ受容体によるシグナル伝達蛋白質の活性強度制御	44
5.1 研究背景.....	44
5.2 実験方法.....	44
5.3 実験結果.....	46
5.4 考察.....	50
6. ボトムアップ型モチーフエンジニアリングを利用したキメラ受容体による造血幹細胞の運命制御	52
6.1 研究背景.....	52
6.2 実験方法.....	52
6.3 実験結果.....	54
6.4 考察.....	59
7. 将来展望と総括	61
7.1 総括.....	61
7.2 将来展望.....	61
8. 参考文献.....	67
9. 業績.....	78
10. 謝辞.....	79

1. 研究背景

1.1 シグナル伝達の研究について

細胞は生体内において様々な役割を担っており、各細胞がそれぞれ増殖、分化、生、死に代表される運命へ導かれることによって、その機能は制御されている。細胞の運命制御には適切な時間的制御と方向性（生・死など）が重要であるため、各細胞には細胞外からの刺激に応答して細胞内の遺伝子発現プロファイルを制御する仕組みが存在する。細胞質内に存在するシグナル伝達蛋白質は、細胞外からの刺激を遺伝子の転写制御システムに伝達する役割を有する蛋白質であり、従ってそれ自身の活性化も通常 ON/OFF に制御されている。主要な例としては蛋白質の翻訳後修飾、特にリン酸化が挙げられる。シグナル伝達蛋白質がリン酸化されると、蛋白質の構造変化が誘起され酵素活性が変化したり、リン酸化部位を中心として新たな分子間相互作用界面が形成されることで、その機能活性が制御される。すなわち細胞内のシグナル伝達蛋白質は細胞の運命を制御するうえで非常に重要な蛋白質であり、それゆえその活性を人為的に制御できる技術は、細胞が重要な役割を果たす医薬・薬学・工学応用に貢献すると考えられる。

実際にシグナル伝達蛋白質を人為的に設計し制御する様々な試みが報告されている[1]。一般的にシグナル伝達蛋白質は相互作用ドメインと機能ドメインに分類することができるため、各ドメインを異なる由来のドメインに置き換えることで、望みの相互作用様式または機能に変更することができる(Fig.1-1)。相互作用ドメインは機能性ドメインの活性の制御や、基質選択性の付与、局在の制御などをする働きを有するため、相互作用ドメインを標的としたキメラ蛋白質はこれらの機能を制御できる可能性を有する。Dueber らは N-WASP が相互作用ドメインによる自己抑制機構を備えていることに着目し、その相互作用ドメインを、ペプチド結合モチーフを有した PDZ ドメインを融合することで、望みのペプチドにより自己抑制制御を解き活性化できるキメラ蛋白質を作製することに成功した[2]。さらに異なるペプチド結合モチーフを有する SH3 ドメインを付与することで、AND ゲート型のリガンド応答性を付与できることも示している[3]。また同様のコンセプトを参考に機能性ドメインをグアニンヌクレオチド交換因子に置換しその機能を変えることも可能である[4]。

1.2 サイトカイン・シグナル伝達経路について

サイトカインとは細胞間でシグナルを伝達するための蛋白質性シグナル伝達分子の総称である。サイトカインは特定の細胞により産生され、その作用範囲は産生細胞自身やその近傍の細胞であることが多く、増殖や分化といった細胞機能を制御する働きを持つ。

サイトカインにはインターフェロン (IFN)、インターロイキン (IL)、増殖因子、神経栄養因子、造血因子、ケモカイン、細胞傷害因子などに大きく分類され多種にわたる。個々のサイトカインは、それぞれに対応した特定のサイトカイン受容体とよばれる膜蛋白質に結合することで細胞内にシグナルを伝達している。

(Fig. 1-1 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig. 1-1 シグナル伝達蛋白質の活性化様式と人工蛋白質の設計例[1] Interaction domain を置き換えることで特定のリガンド応答性を付与することが可能である。また output domain を置き換えることで蛋白質の機能性を変えることが可能である。

一方、サイトカイン受容体は、その細胞外ドメインにより特異的にサイトカインと結合し、細胞内ドメインによって細胞内シグナル伝達経路を活性化することができる。サイトカイン受容体はその構造上の特徴から、以下に例を挙げるようなファミリーに分類される。

- I型サイトカイン受容体：N末端が細胞外に、C末端が細胞内に存在し、膜貫通部位を1つ有する膜タンパク質である。N末端側には4つのシステイン残基の繰り返しや、WSボックスと呼ばれる特徴的なアミノ酸配列をもっている。
- II型サイトカイン受容体：WSボックスはもたないが、システイン残基の繰り返しなど、I型サイトカイン受容体と構造上の類似点がある。代表としてIFN- α , β , γ やIL-10などのサイトカイン受容体がある。
- III型サイトカイン受容体：細胞外ドメインは、システイン残基の豊富なユニットにより構成されている。TNF/Fas受容体ファミリーとも呼ばれ、細胞死の誘導に関わる。
- ケモカイン受容体：7回膜貫通型のGタンパク質結合型受容体である。白血球などの遊走を促進する因子であるケモカインをリガンドとする。
- チロシンキナーゼ型受容体：マクロファージ/コロニー刺激因子(M-CSF)や線維芽細胞増殖因子(FGF)などに対する受容体であり、細胞内にチロシンキナーゼ部位を有している。
- セリン/スレオニンキナーゼ型受容体：TGF- β 受容体ファミリーで、細胞内にセリン/スレオニンキナーゼ部位を有している。
- IL-1受容体：IL-1RI、IL-1RIIなどが該当し、細胞外に免疫グロブリン様配列をもつ。

サイトカイン受容体は細胞内のシグナル伝達蛋白質を活性化させる分子ツールとして広く利用されている。サイトカイン受容体はサイトカインの結合に応答して、細胞内シグナル伝達蛋白質を活性化するが、活性化されたシグナル伝達蛋白質は特定の細胞内蛋白質をリン酸化するキナーゼとして機能したり、別のキナーゼ活性を補佐するスキャフォールドとして機能する。このように形成されたシグナル伝達経路と呼ばれるネットワークは最終的に転写因子の活性化による遺伝子発現制御や、プロテアーゼの活性化を介した蛋白質分解を促し直接的に細胞の運命を制御する。またこのようなカスケード反応はシグナルを増幅する役割としての意義がある。

1.3 サイトカイン受容体のシグナル伝達メカニズムについて

I型サイトカイン受容体のシグナル伝達メカニズムの詳細はFig. 1-2のとおりである。

まずサイトカインが受容体の細胞外ドメインへ結合することにより、受容体鎖の構造変

化や複数の受容体鎖間の近接が誘起される[5]。詳説すると、エリスロポエチン受容体(EPOR)、トロンボポエチン受容体(c-Mpl)、成長因子受容体(GHR)はそれぞれリガンド非存在下において非活性型のホモ 2 量状態が存在することが示されている[6-8]。従ってサイトカインの結合はその非活性型から活性型へ高次構造の変化を通じて遷移することが示唆される。一方、受容体分子は細胞膜上に確率的に分散し、サイトカインは受容体鎖の 2 量化自体を促進する働きがあるとするモデルも提唱されている。これは後述するように細胞外ドメインを別のサイトカイン受容体や抗体断片に置換した受容体キメラ蛋白においてもシグナルを望むとおり伝達できることから説明できる。実際にはこれら 2 つのモデルはどちらも部分的に正しく、双方がリガンド依存的な活性化に寄与していると考えられる。

受容体が 2 量化され活性型となると、受容体の細胞内ドメインに恒常的に結合しているチロシンキナーゼである JAK がリン酸化されることによりキナーゼ活性が回復する。活性化された JAK は受容体の細胞内ドメインに含まれるチロシン残基をリン酸化する。細胞内のシグナル伝達蛋白質はこのリン酸化チロシン残基に結合することができ、それ自体も JAK と近接することによりリン酸化修飾を受け活性化する。

1.4 キメラ受容体研究について

サイトカイン受容体にしばしば確認される変異遺伝子は、機能不全となり重篤な遺伝子疾患となり得ることが知られている。従って受容体の変異体解析はサイトカイン受容体の機能解析または疾患メカニズムの解明に有益である。実際に細胞外ドメインにシステインを導入した EPOR 遺伝子ではシステインによるジスルフィド結合形成の影響でリガンド非依存的な活性化が促進されることから、EPOR の 2 量化がリガンド依存的な受容体の活性化に寄与していることが示されている[9]。また、EPOR の膜貫通ドメインにはロイシンジッパーモチーフを含み受容体鎖のオリゴマー化に寄与しているが、L241G、L242P の変異を導入し機能を失わせることでシグナル活性が抑制されることが示されている[10]。細胞内ド

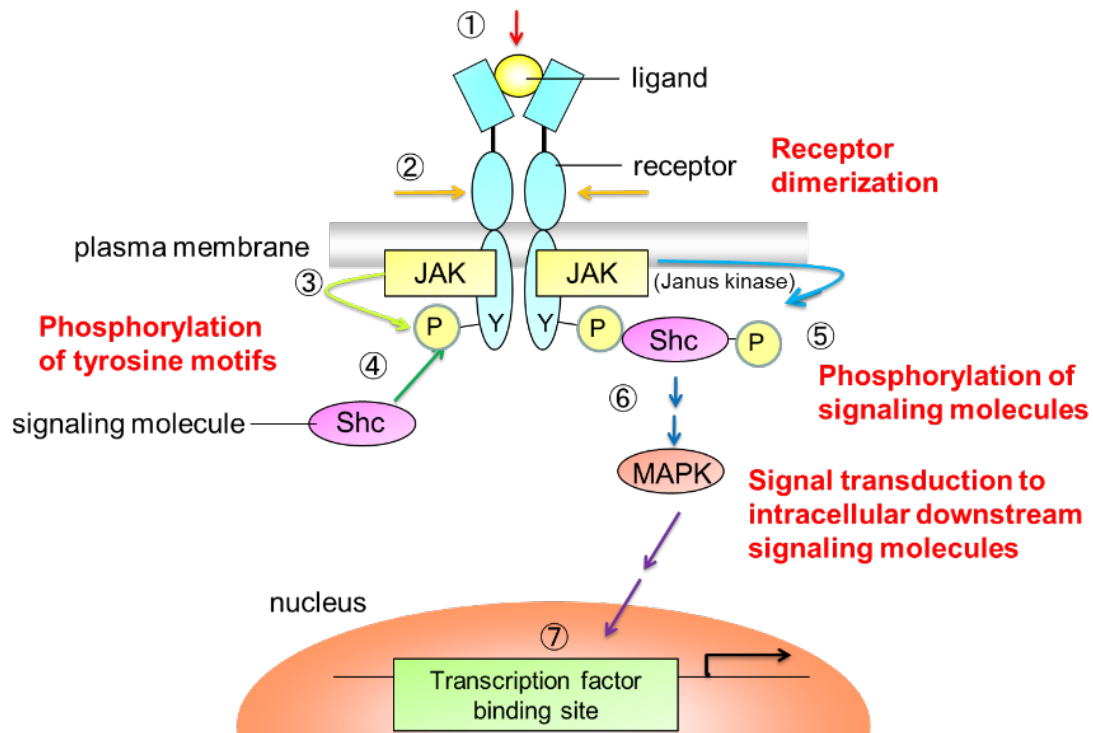


Fig. 1-2 サイトカイン受容体のシグナル伝達メカニズム ①リガンドが受容体に結合②受容体の多量体化③JAK の活性化とチロシンモチーフへのリン酸化④シグナル伝達蛋白質が受容体に結合⑤シグナル伝達蛋白質のリン酸化⑥下流へのシグナル伝達⑦遺伝子の発現制御

メインにおける変異体解析例も多数存在する。先述のとおり受容体の細胞内ドメインに存在するリン酸化チロシン残基はシグナル伝達蛋白質の結合に重要な役割を果たすため、その機能解析においてはチロシンをリン酸化修飾の影響を受けないフェニルアラニン残基に置換した変異体が広く利用されている。例えば Zang らは EPOR の YtoF 変異体を構築することで各チロシン残基のシグナル伝達における役割について言及している[11]。

またこのシグナル伝達メカニズムを利用することで、サイトカイン受容体を人工的に設計し様々な細胞の機能解析に応用された事例が多数報告されている(Fig.1-3)。例えばリガンド未知の受容体によるシグナルを人為的に活性化するため、対象とする受容体の細胞内ドメインとリガンド既知の受容体の細胞外ドメインを融合することで、人工受容体を発現した細胞は既知リガンドにより望みのシグナルを伝達することが可能となる。Kelly-Spratt らはオーファン受容体である Insulin receptor-related receptor (IRR)の細胞内ドメインに TrkB の細胞外ドメインを融合し、TrkB リガンドである BDGF を利用することで IRR が MAPK の活性化を介して神経細胞への分化を誘導することを示した[12]。また Ohashi らは EGFR や c-kit の細胞外ドメインと EPOR の細胞内ドメインを融合することで EGF や SCF の刺激により EPOR 由来の増殖シグナルを誘起できることを示し、EPOR のリガンド

依存的な活性化機構が受容体の 2 量化によるものであることを証明した[13]。また scFv を細胞外ドメインに融合することで、望みのリガンド依存的に様々な細胞の増殖や分化に寄与する受容体のシグナルをそれぞれ誘導することも可能である。先例として c-kit、c-Mpl、EPOR、インスリン受容体、インターロイキン 2 受容体の細胞内ドメインを活用したキメラ受容体の例が挙げられる [14-18]。

(Fig. 1-3 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.1-3 既往の受容体エンジニアリングアプローチ[19] 上段) 受容体蛋白質の変異・挿入・削除を中心としたエンジニアリングモデル 下段) 複数種類の受容体ドメインを連結したキメラ受容体のデザイン

また近年、がん治療において患者由来の T 細胞に特定抗原に対する受容体遺伝子を導入し、T 細胞を患者に戻す chimeric antigen receptor T-cell therapy (CAR-T) 療法が注目されている。CAR は一般に標的がん抗原を認識する scFv と CD3 ζ 等の T 細胞活性化シグナル伝達ドメインのキメラ蛋白として構成され、標的抗原に CAR が結合することで T 細胞による細胞傷害活性を高める作用をもつ。Gross らは初めて TNP に対する抗体の断片を TCR に融合させたキメラ受容体を T 細胞上に発現させることに成功した [20]。また Kochenderfer らは活性化シグナルドメインに加え CD28 や CD137 などの共刺激分子の細胞内ドメインを融合させ活性をさらに高めたキメラ受容体を開発している [21]。共刺激分子シグナルドメインの有無や数によって、第一世代、第二世代、第三世代に分類され、その改良が進んでいる (Fig.1-4)。

(Fig. 1-4 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.1-4 CAR の分子構造[22] 第一世代 CAR は細胞内ドメインに CD3 ζ を融合したデザインである。第二世代 CAR は CD3 ζ とともに共刺激分子のシグナルドメインを 1 つ融合したデザイン、第三世代 CAR は 2 つ以上融合したデザインである。

このような研究はサイトカイン受容体の機能解析または受容体機能に主眼をおいた細胞の運命制御技術の開発に大きく貢献する一方、特定のシグナル伝達蛋白質の機能に主眼をおいた活性化制御においては課題が存在した。すなわち、一般的にサイトカイン受容体はリガンドの刺激により複数のシグナル伝達蛋白質を同時に活性化するため、特定のシグナル伝達蛋白質を解析したり、複数のシグナル伝達蛋白質を対象とした場合にその種類や強度を考慮した活性化パターンを精緻に制御することは困難であった。

1.5 抗体について

本研究では、望みのリガンド分子に応答してシグナルの活性化を誘起できるように、受容

体の細胞外ドメインに抗体断片を融合した。抗体は B 細胞が分泌する可溶性蛋白質の一つであり、標的抗原分子へ結合し、補体系の活性化や食細胞による抗原発現細胞の貪食（オプソニン化）を促進することで、生体内の免疫機能を活性化させる働きをもつ。抗体分子は 2 本の重鎖と 2 本の軽鎖のジスルフィド結合を介した非共有結合により構成される蛋白質である。重鎖、軽鎖はそれぞれさらに可変領域と定常領域に分類される。可変領域は抗原・抗体相互作用に関与するドメインとして機能することが知られており、B 細胞が成熟する過程で引き起こされる遺伝子再編成により、可変領域のアミノ酸配列は B 細胞クローンに応じた多様性を示す。定常領域は、抗体の補体活性やオプソニン化に寄与する領域である。

抗体分子は、可変領域のデザインに応じて様々な抗原に結合できる安定性の高い分子として調製できる可能性を秘めているため、医薬・工学用途に広く利用されている。可変領域は、様々な蛋白質を多機能化するうえで、望みの標的抗原へのターゲティングとしての役割を果たすため、融合蛋白質を形成するドメインの一つとして有用である。特に可変領域断片として重鎖と軽鎖の可変領域をペプチドリinkerを介して融合した一本鎖抗体(single chain Fv, scFv) は、1 遺伝子そのまま融合遺伝子を設計できるため蛋白質工学において扱いやすい分子である。

1.6 チロシンモチーフの研究について

受容体の細胞内ドメインは細胞内で引き起こされる様々なイベントに関与できる機能を有しており、ドメイン、またはモチーフと呼ばれるような、より短い配列的特徴を単位としてその役割が細分化される。例えば I 型サイトカイン受容体はチロシンキナーゼである JAK とその細胞内ドメインで相互作用しているが、JAK は受容体の細胞内ドメインに含まれる Box1、Box 2 と呼ばれる限定的な領域と特異的に相互作用することが知られている。そして Box1、Box2 の配列は I 型サイトカイン受容体ファミリー間でホモロジーがあり、それぞれプロリンと疎水性残基を多く含む特徴があることが知られている。

また、受容体分子は適切にターンオーバーされるために、エンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれたり、ユビキチン化修飾をうけプロテアソームにより分解される必要があるが、受容体の細胞内ドメインに含まれるジロイシンモチーフはエンドサイトーシスに関わるアダプター蛋白質であるクラスリンと相互作用することができ、受容体の細胞質への内在化に寄与している(Fig.1-5)。また EPOR の細胞内ドメインに含まれる Lys256 はユビキチン化修飾をうけることが知られている[23]。

(Fig. 1-5 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.1-5 エンドサイトーシスに関与する受容体細胞内ドメインモチーフ[24] 様々な種類のモチーフが受容体の細胞内ドメインに内在し、それぞれ固有のメカニズムで受容体のインターナライゼーションに関与することが知られている。

本研究では、受容体の細胞内ドメインに存在するチロシンモチーフと呼ばれる一次構造上の特徴に着目した。シグナル伝達蛋白質は受容体の細胞内ドメインに存在するリン酸化チロシン残基を認識して結合するが、受容体に複数存在するどのリン酸化チロシン残基に、どのようなシグナル伝達蛋白質が結合するかは、チロシン残基を中心とする周囲数アミノ酸残基の配列的特徴（これをチロシンモチーフと呼ぶ）により決定される。Songyang はシグナル伝達蛋白質に含まれるホモロジドメイン（SH2 ドメインまたは PTB ドメイン）が、その構造に応じて特定のリン酸化チロシンモチーフに結合することを示した[25]。また Stahl らはサイトカイン受容体である gp130 や LIFR の YtoF 変異体や欠失変異体の解析から、特定のチロシンモチーフが STAT3 の活性化に寄与することを示し、さらに gp130 からすべてのモチーフを欠失させたのちそのモチーフを融合し、融合モチーフ由来のシグナルを伝達できる受容体が構築できることを示すことで、チロシンモチーフの役割を明らかにした[26]。

チロシンモチーフを同定することは、対象とする受容体やシグナル伝達蛋白質の機能解明、またはモチーフアナログを利用したシグナル阻害分子の開発に有益である[27]。実際に既往の研究から特定のシグナル伝達蛋白質の活性化に重要なモチーフが受容体の YtoF 変異体や欠失変異体の解析から同定されてきた[28, 29] (Table 1-1)。例えば DXYΦXΦ (X:任意のアミノ酸、Φ:疎水性アミノ酸)は STAT5 に結合するモチーフとして、NPXY は PTB ドメインを有するシグナル伝達蛋白質に結合するモチーフとして知られている[30, 31]。

このようなモチーフはサイトカイン受容体だけでなく、免疫受容体においても重要な役割を果たす。immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) や immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIMs) は最もよく知られた免疫受容体由来チロシンモチーフであり、それぞれ免疫細胞の活性化と抑制に寄与している。この他 hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif (hemITAM)、the immunoreceptor tyrosine-switch motif (ITSM)、immunoglobulin tail tyrosine (ITT) motif、ITT-like motif などが免疫受容体に含まれる特徴的なモチーフの分類として知られている[32]。

また、天然に存在する受容体由来するモチーフのレパートリーは限られるため、特定の蛋白質に結合するモチーフを人工ペプチドライブラリーからスクリーニングして同定する試みもなされている[33-35]。また、Sheinerman らは配列、構造、動力学的因子をもとに計算化学を活用することにより、各 SH2 ドメインが指向性を示すチロシンモチーフを予測することを試みている[36]。現在では、細胞内のリン酸化イベントはプロテオミクスにより解析することも可能であるため、網羅的なデータを活用してチロシンモチーフの同定とその役割を解明することができる[37, 38]。

Table 1-1 既往のチロシンモチーフ 左からシグナル伝達蛋白質とそれに結合する受容体チロシンモチーフを示す。Xは任意のアミノ酸である。

標的蛋白質	コンセンサスモチーフ	引用文献
STAT1	pYxxP	[39]
STAT3	pYXXQ	[40]
STAT3	pYXXXQ	[40]
STAT5	pYXXL	[41]
STAT5	DXpYΦXΦ	[30]
STAT6	pYXXF	[42]
PI3K	pYMXM	[25]
Shc	pY(I/E/Y/L)X(I/L/M)	[43]
Shc	N(I/V)pY(E/G)T(I/V/L)(W/F)	[34]
Grb2	pYXNX	[44]
Grb2	VpYQN(W/F)	[34]
Cbl	(N/D)XpY(S/T)XXP	[45]
Cbl	DpYR	[46]
Src	pYEEI	[25]
Crk	pYXXP	[25]
Syk	pYEXLXX	[43]
SHIP1	pY(Y/S/T/V)(L/Y/N/I/E/F)	[47]
SHP-2	XVXpY(I/V)X(V/I/L)X(W/F)	[25]
SOCS3	pY(V/A/Y)Φ(V/I/L)Φ(H/Y/V)	[48]
SAP	X(T/S)IpYXX(V/I)X	[49]
FYN	pY(E/T)(E/D/Q)(I/V/M)	[25]
FGR	(N/P/I/Q)EpY(E/D)(N/E)(L/E)(E/D)	[25]
LCK	pY(E/T/Q)(E/D)(I/V/M)	[25]
ABL1	pY(E/T/M)(N/E/D)(P/V/L)	[25]
ITK	pY(A/E/V)(Y/F/E/S/N/V)(P/F/I/H)	[50]
NCK	pY(D/Y)(D/E/L/Y)V	[51]
PLCγ1	pY(V/I/L)(E/D)(L/I/V)	[25]
ZAP-70 (ITAM)	(D/E)XXYXX(L/I)X ₆₋₈ YXX(L/I)	[32]
SHP-1, SHP-2, SHIP-1 (ITIM)	(V/I)XpYXX(L/V)	[32]
Syk (HemITAM)	DEDGYXXL	[32]
SHP-1, SHP-2 (ITSM)	(S/T)XYXX(L/I)	[52] [32]
Grb2, PI3K (ITT)	pYXNM	[32]
Grb2, PI3K (ITT-like)	pYVNY	[32]

1.7 再生医療・遺伝子治療について

細胞機能の人為的な制御は細胞工学が対象とする様々な分野に応用可能であると考えられる。医療用途に目を向けると再生医療分野における遺伝子治療として遺伝子改変細胞が利用されている。遺伝子治療は初め、正常の遺伝子を導入して遺伝子異常を修復することで各種遺伝子疾患を治療するために利用された。例を挙げると Blaese らはアデノシンデアミンナーゼ(ADA)欠損による重症免疫不全症に対する治療として ADA 遺伝子導入 T 細胞投与の有効性を示している[53]。また広義に機能性遺伝子を導入し様々な疾患を治療するアプローチも遺伝子治療と定義され、先述した CAR-T 療法や GM-CSF 発現増殖性ヘルペスウイルス療法はその有望な治療の一つとして注目されている。ゲノム編集技術やアデノ随伴ウイルスベクターなど、より安全性の高い遺伝子導入技術の確立も遺伝子治療の発展に寄与している[54]。従って遺伝子治療の対象疾患は単一遺伝性疾患のみではなく、悪性腫瘍、循環器疾患、感染症、心血管疾患、神経疾患へと近年拡大している状況である(Fig.1-6)。

(Fig. 1-6 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.1-6 遺伝子治療の対象疾患[55] 遺伝子治療が行われた臨床試験数を疾患別に示す。

1.8 造血幹細胞について

遺伝子治療において造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)はその細胞ソースとして広く利用されている。HSC は赤血球、白血球、血小板などの血球系細胞の全てに分化できる多分化能と、多分化能を維持したまま分裂し増殖する自己複製能を兼ね備えた細胞として定義される(Fig.1-7) [56-61]。

造血幹細胞から分化する主な成熟細胞とその役割はつぎのとおりである。

- ・ 赤血球：ヘモグロビンを構成成分としてもち、血液中で体内への酸素運搬を行なう。
- ・ 顆粒球：体内に侵入してくる細菌などに対して貪食、殺菌能力をもつことで生体内環境を守る。好中球、好酸球、好塩基球の3分類に分けられる。
- ・ リンパ球：B細胞、T細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞などはこれに属し、抗体産生や体内の免疫システムの活性化に寄与している。
- ・ 単球：マクロファージに分化し、異物の貪食を行なうとともに、サイトカインの分泌により免疫応答を調節する働きを持つ。
- ・ 血小板：血管が損傷した時に凝集し、傷口をふさぐことで出血を止める役割がある。
- ・ 肥満細胞：ヘパリン、ヒスタミン、セロトニンなどを細胞内に貯めこみ、IgE 抗体と、外部からの抗原の結合によりそれらの化学物質を細胞外に放出する。体内に様々な影響を及ぼす。アレルギーとも深い関わりがある。
- ・ 樹状細胞：抗原提示細胞として、自身が取り込んだ抗原をペプチドに分解して主要組織適合遺伝子複合体(MHC)上に提示し T 細胞に伝える役割を持つ。

(Fig. 1-7 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.1-7 血球系細胞の分化系譜 [62] long-term hematopoietic stem cells(LT-HSCs), multipotent progenitors (MPPs), common myeloid progenitors (CMPs), common lymphoid progenitors (CLPs), megakaryocyte/erythrocyte progenitors (MEPs), granulocyte/macrophage progenitors (GMPs), lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPPs), Macrophage-DC progenitors (MDPs), classical DCs (cDCs), plasmacytoid DCs (pDCs), common DC progenitors (CDPs)

造血幹細胞からこれらの細胞への分化は種々の前駆細胞を経て段階的に行なわれる。また分化した成熟細胞には寿命があり、造血組織により供給されないと徐々に減っていくため、造血幹細胞の自己複製能は血球系細胞の維持にとって非常に重要な機能である。

1.9 造血幹細胞の自己複製について

造血幹細胞の自己複製には様々な細胞外因子が関与することが知られている(Fig.1-8)。可溶性サイトカインとしては、SCF と TPO の 2 つが自己複製に必要な基本因子として同定されており、これらは本研究においても利用された。SCF は造血幹細胞上に発現している受容体 c-kit に結合しその機能を発揮する[63]。c-kit 遺伝子改変マウスまたは抗 c-kit 抗体を用いた試験から、c-kit の機能不全は造血前駆細胞や成熟細胞の減少を促し胎生致死を引き起こすことが知られている[64, 65]。HSC の *in vitro* 培養系においても SCF の添加が HSC の生存に寄与し[66, 67]、IL-3、IL-6、IL-11、IL-12、IL-27、TPO と協調的な作用を示す[68, 69]。一方、TPO は初め巨核球因子として同定されたサイトカインである。TPO の HSC への作用は、HSC の *in vitro* 培養系において TPO により効率的に HSC を増幅できることから示された[70, 71]。また TPO に対する受容体である c-Mpl 遺伝子を欠損した HSC は放射線照射マウスにおける造血再構成能を示さなかったことから、HSC の幹細胞活性の維持に重要であることが示唆されている[72]。その他 CXCL12、TGF- β 、IFN、Notch、Ang-1 も各種遺伝子改変マウスモデルを用いた解析などから見出されている[73]。生体内においては造血幹細胞が存在する微小環境(造血幹細胞ニッチ)も重要な役割を果たすことが知られている。造血幹細胞ニッチの構成因子としては、血管周囲細胞、血管内皮細胞、CXCL12 abundant 細胞、骨芽細胞、神経細胞などがある[74]。

これらの外部刺激を受けた造血幹細胞は転写因子の活性化とそれに続く遺伝子発現を制御することで直接的に自己複製能を発揮する。造血幹細胞の自己複製に必要な転写因子としては、自己複製に寄与する因子とともに、細胞周期を G0 期にとどめ幹細胞機能を有する細胞の維持に重要な因子が存在する。前者の例として Pbx-1、Evi-1 などが挙げられ、後者の例として Scl、Egr-1、Gfi-1、PU.1、FoxO、P53 などが挙げられる[75]。

(Fig. 1-8 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.1-8 造血幹細胞の自己複製に関与する因子[75] 左からリガンド、受容体、関与が示された評価モデル、造血幹細胞機能への影響を示す。

1.10 造血細胞を用いた遺伝子治療について

このとおり造血幹細胞はそこから分化する血球系細胞になり得る性質を有するため、血球系細胞において機能する様々な遺伝性疾患や血液癌において、有効な移植細胞として用いることができる[76, 77]。ヒト白血球抗原(HLA)は個体ごとに構造が異なる膜蛋白質であり、体内の免疫システムが自己か非自己を認識するために重要な抗原であるが、HLAの構造の不一致が多いほど、生着不全や移植片対宿主病(GVHD)などの有害な合併症の発症率が高まる。従って非血縁ドナーからの移植にはリスクが伴うため、現状は患者自身の造血幹細胞の遺伝子を修復した後移植する方法で治療されることが多い(Fig.1-9)。具体的には、患者の骨髄やサイトカイン刺激で動員した末梢血細胞から、CD34陽性細胞分画を採取する。採取した造血幹細胞はサイトカインで刺激されたのち、ウイルスベクターにより遺伝子導入される。近年はゲノム挿入後にLTR中の活性配列が失われるよう改変を加え、挿入変異による副作用が低減されたSINベクターが利用されることが多い。遺伝子導入後の細胞は静脈内へ投与される。また輸注された細胞が骨髄中に生着することを促進するため、抗がん剤を前処置として投与されることが多い。

(Fig. 1-9 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.1-9 造血幹細胞を用いた遺伝子治療[78] 患者由来の造血幹細胞分画の採取から、遺伝子導入後の静脈内再投与までの流れを示す。

対象疾患の一つとして原発性免疫不全症(PID)が挙げられる。これは免疫細胞が関与する単一遺伝子病であるため、根治治療として遺伝子治療が適している。また免疫細胞の起源は造血幹細胞であるため、健常な造血幹細胞が移植細胞として用いられる。PIDに含まれる具体的な対象疾患としてADA欠損症、X-連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)、ウィスコットオルドリッチ症候群(WAS)、慢性肉芽腫症(CGD)が挙げられる[79]。例としてADA欠損症について述べると、ADAは核酸の代謝過程で生じる毒素を脱アミノ化し、毒性を失わせる酵素として機能する。ADAが欠損するとこの毒素が蓄積し、高感受性のリンパ球が重篤な障害を受けることで免疫不全症に至る[80]。AiutiらはADA酵素補充療法を止め、抗がん剤による前処置をおこなう方法で、造血幹細胞を標的としたADA欠損症に対する遺伝子治療法を開発した[81]。現在は体外遺伝子治療細胞加工品として、製造販売が承認されている。

1.11 造血幹細胞の体外増幅について

しかしHSCは全骨髄細胞のうち0.004%と非常に低頻度でしか存在していないため、

HSC を移植細胞として利用するためには、生着不全を防ぐため十分な細胞数の確保が必要である。また移植細胞が骨髄に生着することを促進するため移植の前処置として抗がん剤投与が必要であるが、幹細胞活性の高い細胞を移植することで前処置による影響を軽減することができ、患者の予後を改善すると期待される。これまで HSC を体外増幅させる技術または HSC の機能を向上させる技術の確立を目指し、様々な研究結果が報告されている (Fig.1-10)[82-85]。1.9 で記述した造血幹細胞の自己複製に重要な因子の活性を制御するため、可溶性の成長因子、サイトカイン、化合物の利用や特定の細胞による共培養などが体外増幅を促進する方法として挙げられる [86]。

共培養されるストローマ細胞には、大動脈・性腺・中腎領域細胞 (AGMs)、胎児肝細胞、骨髄ストローマ細胞、内皮細胞、間葉系幹細胞などが含まれる。特に MSC はよく利用されており、MSC から分泌される可溶性サイトカインや、細胞間相互作用が造血幹細胞の増殖に重要な役割を果たすことが知られている。実際に臨床試験において MSC と HSC の共培養は、安全な生着、総有核細胞数の増加、好中球や血小板のすばやい回復が確認されている [82]。可溶性サイトカインとしては、SCF、TPO、FLT3、IL-3、IL-6 などが広く利用される。その他、Notch リガンド、Wnt など利用できる新たな因子が見出されている (Fig.1-10)。

(Fig. 1-10 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.1-10 ヒト造血幹細胞の体外増幅法 [86]

1.12 研究概念について

ここまで、細胞内シグナルを人為的に活性制御する技術の重要性、キメラ受容体を利用したシグナル活性制御の例と既往技術の課題、課題解決のために注目されるチロシンモチーフの役割について詳述した。これらを受けて本研究では、新規エンジニアリングアプローチを活用したキメラ受容体を用いて、細胞内シグナルの人為的な活性制御を試みた。具体的には、受容体の細胞外ドメインに一本鎖抗体 (scFv) を、細胞内ドメインにチロシンモチーフを人工的に配置することで、望みの分子を引き金に、望みの蛋白質を活性化できる受容体を構築できると考えた (Fig. 1-11)。

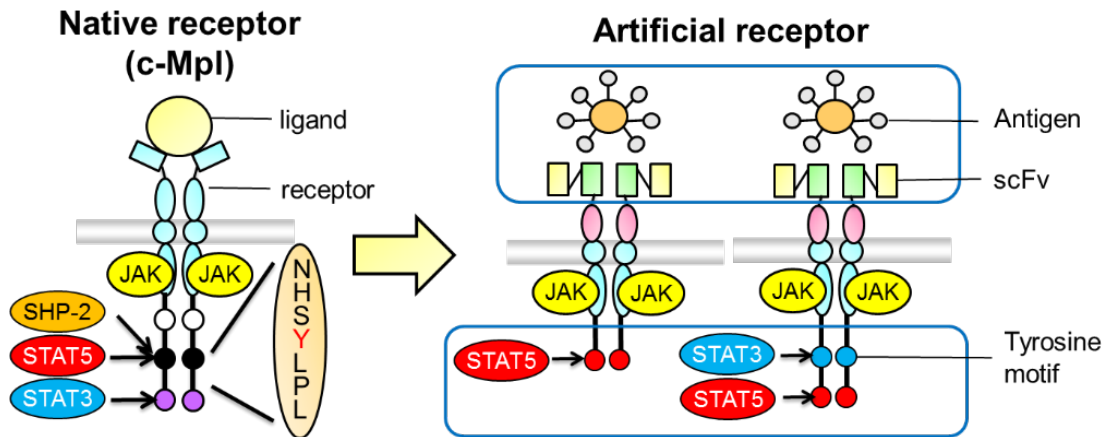


Fig.1-11 本研究で構築するキメラ受容体の概念図 c-Mpl を例とした Native receptor は異なる複数のチロシンモチーフを内在している。Artificial receptor は望みのチロシンモチーフを融合することで任意のシグナル伝達蛋白質を活性化することが可能である。

受容体のエンジニアリングは 2 種類のアプローチを検討した。トップダウンモチーフエンジニアリングと呼ぶアプローチは、既知の受容体の細胞内ドメインを由来とし、それに含まれるチロシンモチーフに対して変異・除去等の改変を加える手法である。一方ボトムアップモチーフエンジニアリングと呼ぶアプローチは、細胞内ドメインのキナーゼ機能やチロシンモチーフをゼロベースから組み立てる手法である。それぞれの手法により構築された受容体が望むシグナル伝達蛋白質を活性化できるか本研究の中で検証した。

本研究では構築された受容体を、造血幹細胞移植技術の改良へ応用することを試みた。天然のサイトカインリガンドでは達成できない人工的なシグナル伝達蛋白質の活性化パターンをキメラ受容体で誘導することにより、さらなる HSC の体外増幅効果の向上を試みている。

本論文の構成はつぎのとおりである(Fig.1-12)。Chapter I ではトロンボポエチン受容体 c-Mpl を鋳型としたトップダウン型のモチーフエンジニアリングとその HSC 研究への応用について述べる。Chapter II 以降はボトムアップ型のモチーフエンジニアリング研究について記載する。II-IV では受容体エンジニアリングの観点から、このアプローチにおいて自由度の高いエンジニアリングが可能であることを示す。具体的に II ではモチーフエンジニアリングの基本コンセプトであるモチーフ配列依存的なシグナル活性制御が可能であることを、III では 2 つ以上のモチーフを利用し複数のシグナルを同時に活性化できることを、IV では導入モチーフ数に応じてシグナルの活性化強度を制御できることをそれぞれ示した。最後に V ではボトムアップ型のモチーフエンジニアリングを利用して構築された受容体を用いた、HSC 研究への応用について記載する。

Chapter I: トップダウン型モチーフエンジニアリングを利用したキメラ受容体による

- る造血幹細胞の運命制御
- Chapter II: ボトムアップ型モチーフエンジニアリングによるキメラ受容体の活性制御
- Chapter III: 異なるチロシンモチーフを利用したキメラ受容体による複数のシグナル伝達蛋白質の同時活性化
- Chapter IV: 複数のチロシンモチーフを利用したキメラ受容体によるシグナル伝達蛋白質の活性強度制御
- Chapter V: ボトムアップ型モチーフエンジニアリングを利用したキメラ受容体による造血幹細胞の運命制御

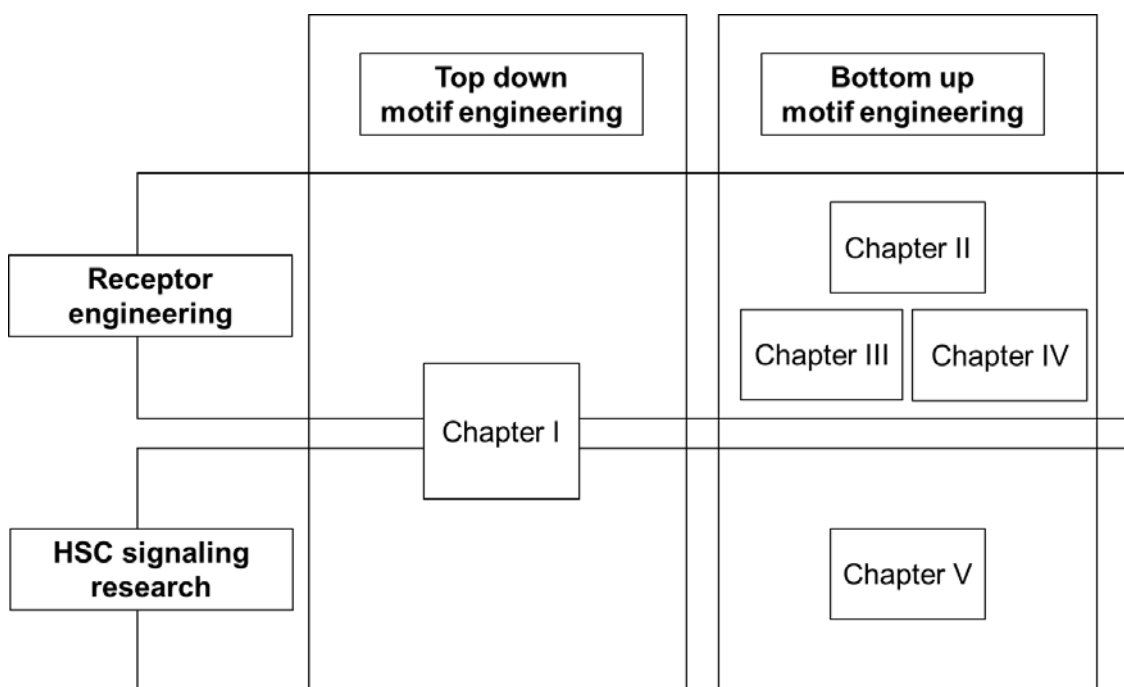


Fig. 1-12 本論文の構成 研究目的を基礎的な受容体エンジニアリング技術確立と造血幹細胞研究への応用に、受容体のエンジニアリングアプローチをトップダウン型とボトムアップ型にそれぞれ分類し、各チャプターが対象とする研究領域を示す。

1.13 略語

ADA	adenosine deaminase
BDGF	brain-derived growth factor
BSA	bovine serum albumin
CAR	chimeric antigen receptor
CD34-KSL 細胞	CD34-, c-Kit+, Sca-1+, Lineage marker-細胞
CGD	chronic granulomatous disease (慢性肉芽腫症)
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EC ₅₀	half maximal (50%) effective concentration
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor (上皮成長因子)
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPO	erythropoietin
EpoR	erythropoietin receptor
FBS	fetal bovine serum
Fc	fragment crystallizable region (重鎖定常領域)
FGF	fibroblast growth factors (線維芽細胞増殖因子)
FL	fluorescein
GHR	growth hormone receptor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
gp130	glycoprotein 130
GVHD	graft versus host disease (移植片対宿主病)
HA	hemagglutinin
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HLA	human leukocyte antigen (ヒト白血球型抗原)
HRP	horseradish peroxidase
HSC	hematopoietic stem cell 造血幹細胞
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
IRR	insulin receptor related receptor
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
ITSM	immunoreceptor tyrosine-based switch motif

ITT	immunoglobulin tail tyrosine
JAK	Janus kinase
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor
LTR	long terminal repeat
MAPK	mitogen activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex (主要組織適合遺伝子複合体)
MOI	multiplicity of infection
MoMLV	Moloney murine leukemia virus
MSC	mesenchymal stem cell
NK 細胞	natural killer 細胞
PBS	phosphate buffered saline
PCMV	PCC4 cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus
PCR	polymerase chain reaction
PTB	phospho-tyrosine binding
PDZ	PSD-95/Dlg-A/ZO-1
PE	R-phycoerythrin
PI	Propidium Iodide
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PID	primary immunodeficiency disease (原発性免疫不全症)
PLL	poly-L-lysine
SCF	stem cell factor 幹細胞因子
scFv	single chain Fv
SE	standard error (標準誤差)
SH2	Src homology 2
Shc	Src homology 2 domain-containing-transforming protein C1
STAT	signal transducers and activator of transcription
TBS	tris-buffered saline
TCR	T cell receptor
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TPO	thrombopoietin トロンボポエチン
VSVG	vesicular stomatitis virus glycoprotein
WAS	Wiskott-Aldrich syndrome
X-SCID	X-linked severe combined immunodeficiency

2. トップダウン型モチーフエンジニアリングによるキメラ受容体の活性制御

第2章の内容は、公開について共著者の同意を得られていないため除外している。

3. ボトムアップ型モチーフエンジニアリングによるキメラ受容体の活性制御

3.1 研究背景

2章ではトップダウン型のモチーフエンジニアリングについて詳述した。このアプローチは比較的簡便な変異体構築により望みの結果が得られる一方、野生型の受容体に内在する複雑なシグナルネットワークの影響を精緻に予測し制御することが困難であることが課題であった。

本章では、トップダウン型モチーフエンジニアリングに比べ、さらに自由度高く、所望のシグナル活性を示すことができる受容体デザイン手法として、ボトムアップ型モチーフエンジニアリングのアプローチを検討した。これはチロシンモチーフを含まない受容体細胞内ドメインをベースに、モチーフの全てを人為的に付与するデザインアプローチである。

既往の報告から、特定のモチーフに由来するシグナルを特異的に伝達することができる受容体を構築した事例を挙げるができる。Stahlらはサイトカイン受容体である gp130 や LIFR の YtoF 変異体や欠失変異体の解析から特定のチロシンモチーフが STAT3 の活性化に寄与することを示し、さらに gp130 からすべてのモチーフを欠失させたのち特定のモチーフを融合することで、融合モチーフ由来のシグナルを伝達できる受容体が構築できることを示しチロシンモチーフの役割を明らかにした[26]。また Wiederkehr-Adam らは STAT1、STAT3 に対するペプチド性阻害剤を開発するために、各シグナル伝達蛋白質に結合するチロシンモチーフ配列をスクリーニングし、さらにそれらをすべての内因性モチーフを欠失させた EPOR に融合することで、STAT1、STAT3 が活性化できること、すなわちリン酸化モチーフが STAT1 と STAT3 に結合できることを示した[87]。

従って本研究では、このような受容体デザインを医薬・工学用途に応用するための汎用的なプラットフォーム開発を試みた。本章では具体的に、ボトムアップ型モチーフエンジニアリングアプローチの中で、チロシンモチーフの配列的特徴に依存してシグナル伝達蛋白質の活性化が変わることを抗体/受容体キメラを用いて検証した。

3.2 実験方法

ベクター構築

pGCDNsam HA-S-Mpl-I/E に対して、S-Mpl の細胞内ドメイン 70 残基目に *Mlu*I 認識サイトと、その直後にストップコドンを入れるため、PCR により部位変異導入をおこない pGCDNsam HA-Smplt69-no_motif-I/E を作製した(Table 3-1)。チロシンモチーフを受容体遺伝子の C 末端に挿入するため、各モチーフ遺伝子、ストップコドン、両端に *Mlu*I、*Bam*HI サイトを含むオリゴヌクレオチドセットをアニーリングさせることでインサート遺伝子を調製し、*Mlu*I、*Bam*HI で制限酵素処理した pGCDNsam-HA-Smplt69-no_motif-I/E に挿入することで、pGCDNsam-HA-Smplt69-(STAT1, STAT3, STAT5, PI3K, Shc)-I/E を得た(Table 3-2)。

Table 3-1 pGCDNsam-HA-Smplt69-no_motif-I/E 構築用 PCR プライマー

S-MplT69 sense	ctacgcgtgtgacaggcccagatggactaccgaagattgc
S-MplT69 antisense	ctgtcacacgcgtaggggcaaaggagtcctctctgagg

Table 3-2 モチーフ遺伝子付加用オリゴヌクレオチド

STAT1 binding motif sense	cgcgtgccacctcctttggttatgataaaccacatgtgctatgag
STAT1 binding motif antisense	gacctcatagcacatgtggttatcataaccaaaggaggtgggca
STAT3 binding motif sense	cgcgtggtggtacacagtggctacagacaccaagttccgcatgag
STAT3 binding motif antisense	gacctcatgacggaacttggtgtctgtagccactgtgtaccacca
STAT5 binding motif sense	cgcgtgcttatggacaatgctacttctgtgaggcagattgag
STAT5 binding motif antisense	gacctcaatctgcctcacagaagtaggcattgtccataagca
PI3K binding motif sense	cgcgtgcctctgcctccaagctatgtggttctctctgag
PI3K binding motif antisense	gacctcaagagcaagccacatagcttgaggcagaggca
Shc binding motif sense	cgcgtgacccctgtcattgaaaatccccagtaactttggcatctgag
Shc binding motif antisense	gacctcagatgccaaagtaactggggattttcaatgacaggatca

各遺伝子の塩基配列は 2 章と同様の手法で実施した。

細胞株

リポフェクション

レトロウイルストランスダクション

フローサイトメーターによる EGFP 発現細胞の検出

フローサイトメーターによるキメラ受容体発現量の確認

2 章と同様の手法で実施した。

ウエスタンブロットティング

2 章と同様の手法で実施した。ウエスタンブロットティングに使用した 1 次抗体は Table3-3 のとおりである。

Table 3-3 ウエスタンブロットティング用抗体

抗体名	製造元	型番	希釈率
Phospho-STAT1 (Tyr701) Antibody	Cell Signaling Technology	#9171S	1:1000
STAT1 Antibody	Cell Signaling Technology	#9172	1:1000
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	#9145L	1:2000
STAT3 (C-20) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	sc-482	1:1000

p-STAT5 (Y694) Rabbit Ab	Cell Signaling Technology	#9351S	1:1000
STAT5 (c-17) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	sc-835	1:1000
p-PI3-kinase p85 α (Tyr508)	Santa Cruz	sc-12929-R	1:1000
Anti-PI3 Kinase p85 (rabbit anti serum)	upstate	#06-195	1:2000
p-Shc (Tyr239/240)-R	Santa Cruz	sc-18074-R	1:1000
Shc (H-108)	Santa Cruz	sc-1695	1:1000
Phospho-JAK2(Tyr1007/1008) Antibody	Cell Signaling Technology	#3771	1:1000
Anti-JAK2 Antibody	upstate	06-255	1:2000
Rabbit-anti HA affinity purified 0.1ml	BETHYL	A190-108A-2	1:1000
β -tubulin (H-235) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	sc-9104	1:1000
HRP 標識 goat anti-Rabbit IgG	Biosource	ALI3404	1:4000

Ba/F3 細胞増殖アッセイ

Ba/F3 細胞を PBS で 2 回洗浄後、10000 cells/well で 96 well plate に 100 μ l 播種した。計測時に、各 well につき Propidium iodide (終濃度 2 μ M)、4 μ l Flow Count Fluorospheres (Beckman Coulter、約 980 個/ μ l)を、PBS で希釈し懸濁液として添加し、FACS Calibur で細胞数を測定した。

3.3 実験結果

まず始めに、モチーフ配列に依存して受容体が活性化シグナルのパターンを変えることができるか確認するため、異なるチロシンモチーフを付与した受容体が異なるシグナルパターンを示すことを検証した。

標的とするシグナル伝達蛋白質として STAT1、STAT3、STAT5、PI3K、Shc の 5 種類を選定した。これらは様々なサイトカイン受容体により活性化され細胞の増殖や分化に寄与している。STAT1、STAT3、STAT5 は JAK-STAT 経路に分類されるシグナル伝達経路に寄与する蛋白質である。JAK によりそれらがリン酸化されると細胞内で 2 量化する事で転写因子として機能する[88]。PI3K は PI3K-Akt 経路に関与し、細胞周期を制御することや、Bad、Forkhead ファミリーなどのプロアポトーシスシグナルを直接阻害することによって細胞の生存を調節する機能を有する[89]。また Shc は MAPK 経路に関与し、RAS/RAF/MEK/ERK を活性化するためのアダプター蛋白質として機能することが知られている[90]。

また、これらのシグナル伝達蛋白質に結合する天然の受容体を由来とするチロシンモチーフを既往の報告から選定した[31, 87, 91, 92] (Fig.3-1)。

シグナル伝達分子	チロシンモチーフ	モチーフの由来となる受容体
STAT1	PTSFGYDKPHVL	インターフェロン γ 受容体1
STAT3	VVHSGYRHQVPS	gp130
STAT5	IMDNAYFCEAD	成長ホルモン受容体
PI3K	PLPPSYVACS	エリスロポエチン受容体
Shc	IPVIENPQYFGI	脳由来神経栄養因子受容体

Fig.3-1 各シグナル伝達分子を結合するチロシンモチーフのアミノ酸配列

これらモチーフを人工的に受容体内に組み込む際に用いる鋳型となる受容体として、S-Mpl を使用した。c-Mpl の細胞内ドメインは上流に Box1 と Box2 と呼ばれる JAK ファミリーキナーゼである JAK2 と Tyk2 が結合する領域が存在し、その下流に 3 つのチロシンモチーフを有している[93, 94]。従って S-Mpl の細胞内ドメインから、活性化に必須な JAK が結合する領域を含む上位配列 (R⁵¹⁴-L⁵⁸²) を保存し、その直後に各モチーフを融合した受容体を作製した(Fig. 2-2 B, Fig. 3-2)。JAK 結合領域とチロシンモチーフの間には遺伝子構築に必要な *Mlu* I 認識配列に由来する Arg-Val のスペーサー配列が付与されている。本受容体は細胞外ドメインに抗フルオレセイン一本鎖抗体を有しているため、BSA-FL をリガンドとして認識することができる。

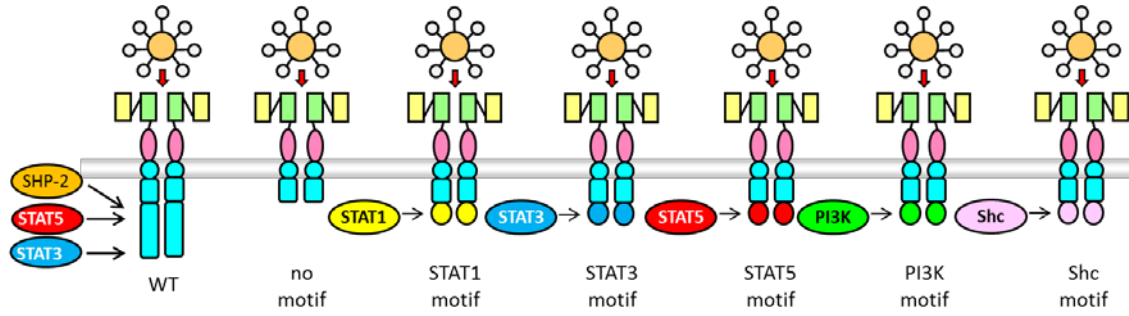


Fig.3-2 モチーフ融合キメラ受容体の構造

これらのキメラ受容体をレトロウイルスベクターにより IL-3 依存的な細胞増殖性を示す Ba/F3 細胞に遺伝子導入して発現させ、EGFP 陽性細胞をフローサイトメーターで単離することで遺伝子導入細胞を得た。遺伝子導入率を、EGFP 陽性率を指標に評価した結果、すべての遺伝子導入細胞について 90%以上の EGFP 陽性率を示すことが確認された (Fig.3-3, linker 0)。

また、各キメラ受容体の発現確認をフローサイトメーターとウェスタンブロッティングにより測定した(Fig.3-4, linker 0)。その結果、全てのキメラ受容体が細胞膜表面に設計配列を全長で発現していることが確認された。またその発現量は各遺伝子導入細胞すべて WT と同等であった。

各キメラ受容体によるリガンド依存的な JAK の活性化を、抗リン酸化 JAK2 抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検証した(Fig.3-5)。その結果、構築したすべての受容体についてリガンド依存的な JAK2 のリン酸化が確認された。またその活性化量はすべての遺伝子導入細胞についてほぼ同等であった。従って各受容体がリガンド依存的にリン酸化カスケードを活性化できることが示唆された。

さらに標的とするシグナル伝達蛋白質の活性化を各蛋白質に対する抗リン酸化抗体を用いて検証した (Fig.3-6)。その結果、IL-3 刺激または WT の BSA-FL 刺激条件においては標的としたシグナル伝達蛋白質を全て活性化できることが示された。また全ての受容体がりガンド刺激により STAT5 を活性化したが、no motif はそれ以外のシグナル伝達蛋白質は活性化しないことが明らかとなった。一方で各チロシンモチーフを融合した受容体は標的とするシグナル伝達蛋白質を活性化することができた。また各受容体による 5 種類の蛋白質の活性化パターンは WT や no motif、各モチーフ間で異なることから、各受容体の活性化パターンはモチーフ配列に大きく依存していることが示された。

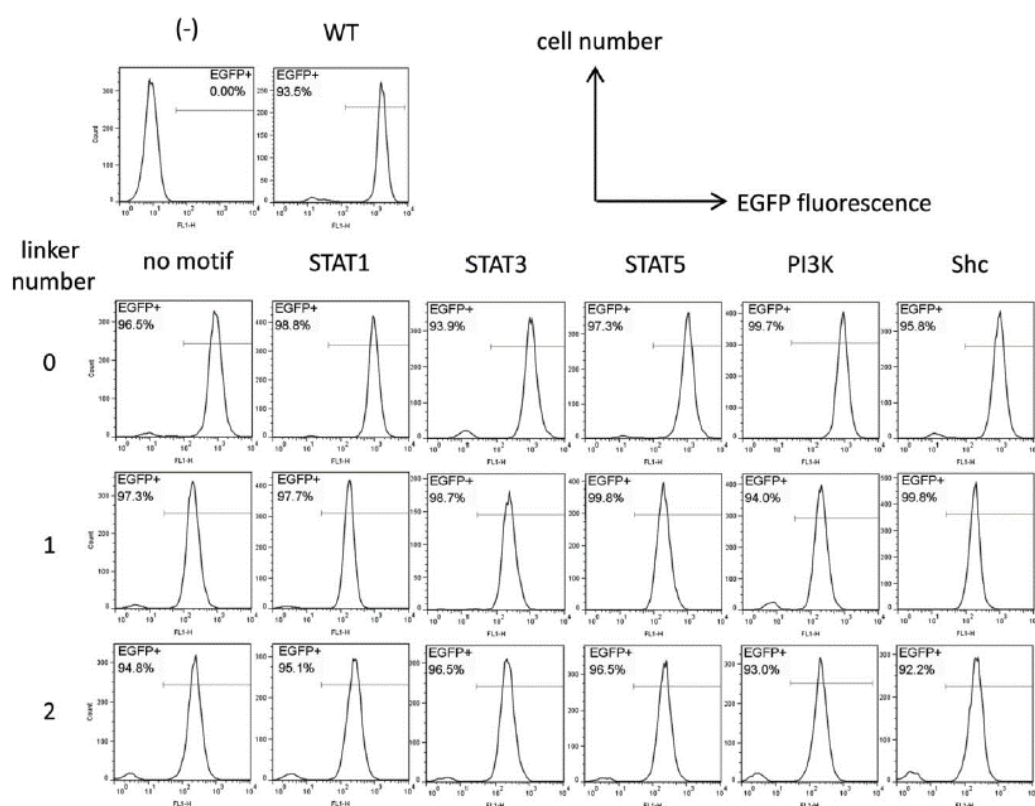


Fig. 3-3 各キメラ受容体発現細胞の遺伝子導入率 EGFP の蛍光強度の細胞数ヒストグラムを示す。

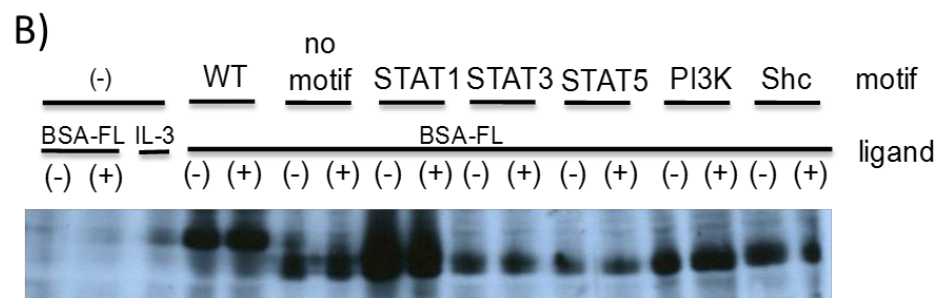
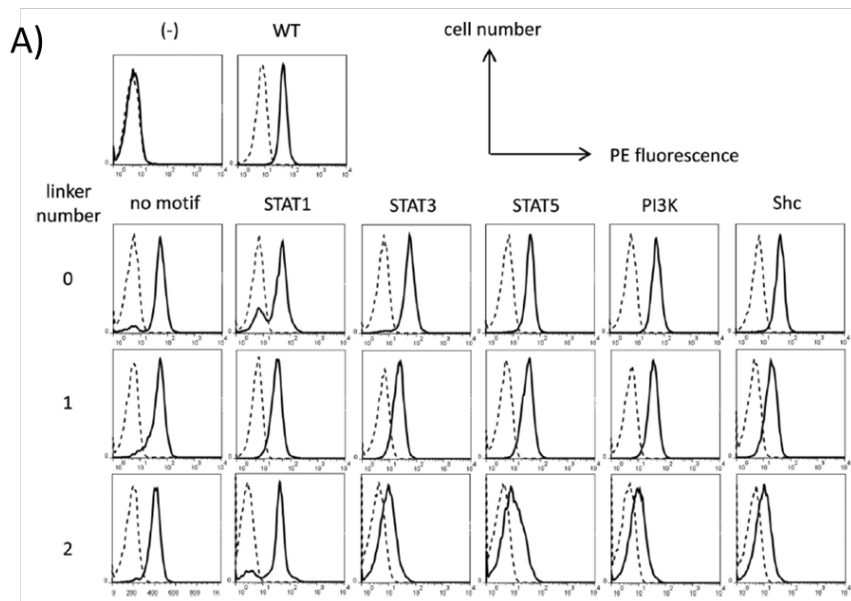


Fig. 3-4 キメラ受容体の発現確認

A) フローサイトメーターによるキメラ受容体発現確認 実線は PBS, 点線は PE 標識 抗 HA 抗体により染色したサンプルであり、横軸は PE 蛍光強度、縦軸は細胞数を表す。B) ウェスタンブロッティングによるキメラ受容体発現確認 BSA-FL(1 $\mu\text{g/ml}$)、IL-3(1 ng/ml)、15 分間リガンド刺激 WT : 57kDa, no motif : 51kDa, S-*mpl*(T69)-[motif] : 52-53kDa

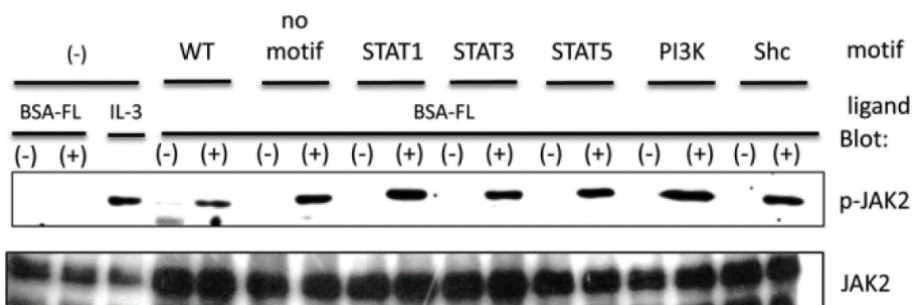


Fig. 3-5 キメラ受容体活性化による JAK のリン酸化
BSA-FL(1 $\mu\text{g/ml}$)、IL-3(1 ng/ml)、15 分間リガンド刺激

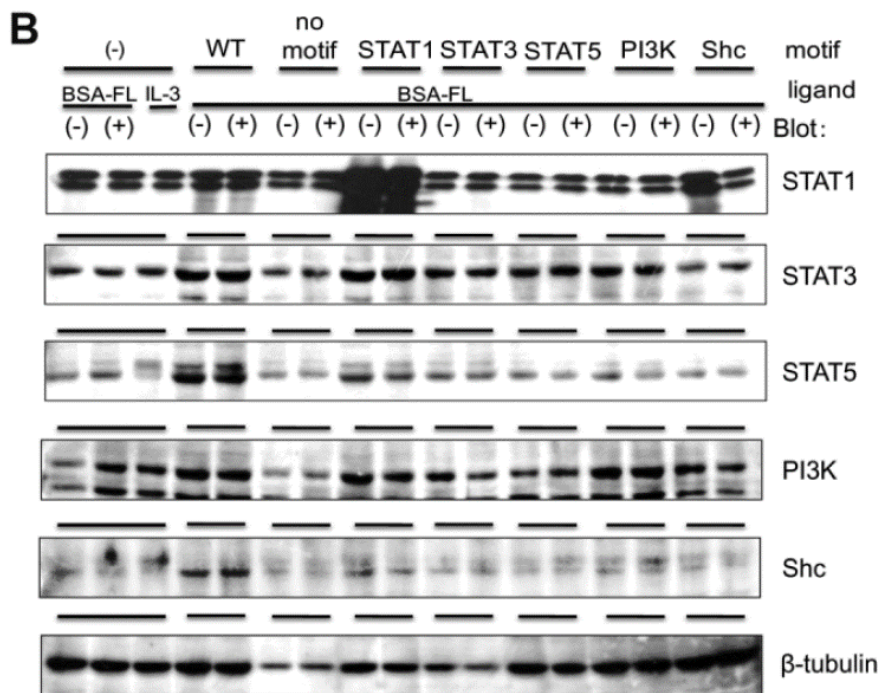
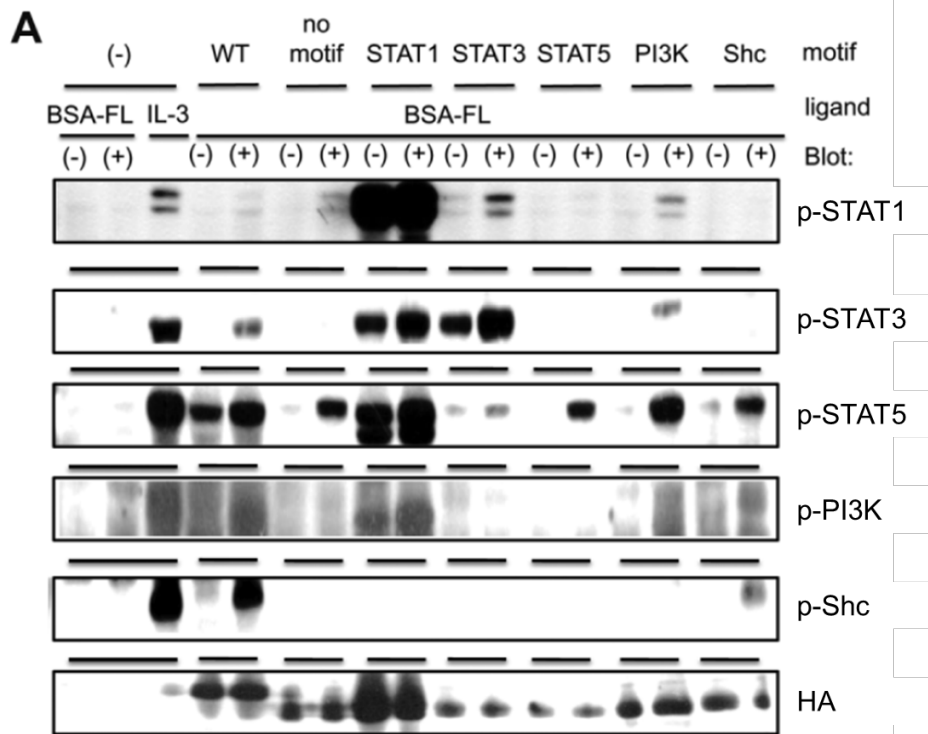


Fig. 3-6 各受容体のシグナル伝達蛋白質活性化

A) ウェスタンブロッティングによるリン酸化シグナル伝達蛋白質の検出 B) ウェスタンブロッティングによるシグナル伝達蛋白質発現量の比較 BSA-FL(1 μ g/ml)、IL-3(1 ng/ml)、15分間リガンド刺激

構築した受容体により活性化されたシグナル伝達蛋白質が、望みどおりにカスケード下流へシグナルを伝達し、細胞の機能に影響を与えることができるか検証するため、各受容体発現 Ba/F3 細胞を用いてリガンド刺激に応じた細胞増殖能を検証した(Fig. 3-7)。その結果、遺伝子未導入の細胞や no motif、STAT1 結合モチーフを有する受容体ではリガンド刺激依存的な細胞増殖が確認されなかったが、それ以外の受容体については発現細胞の増殖が確認され、受容体に起因するシグナルが下流へ伝達されていることが示唆された。細胞増殖効果は複数のシグナル伝達蛋白質を活性化できる WT が最も高く、次いで STAT5 や PI3K 結合モチーフを有する受容体発現細胞が高かった。

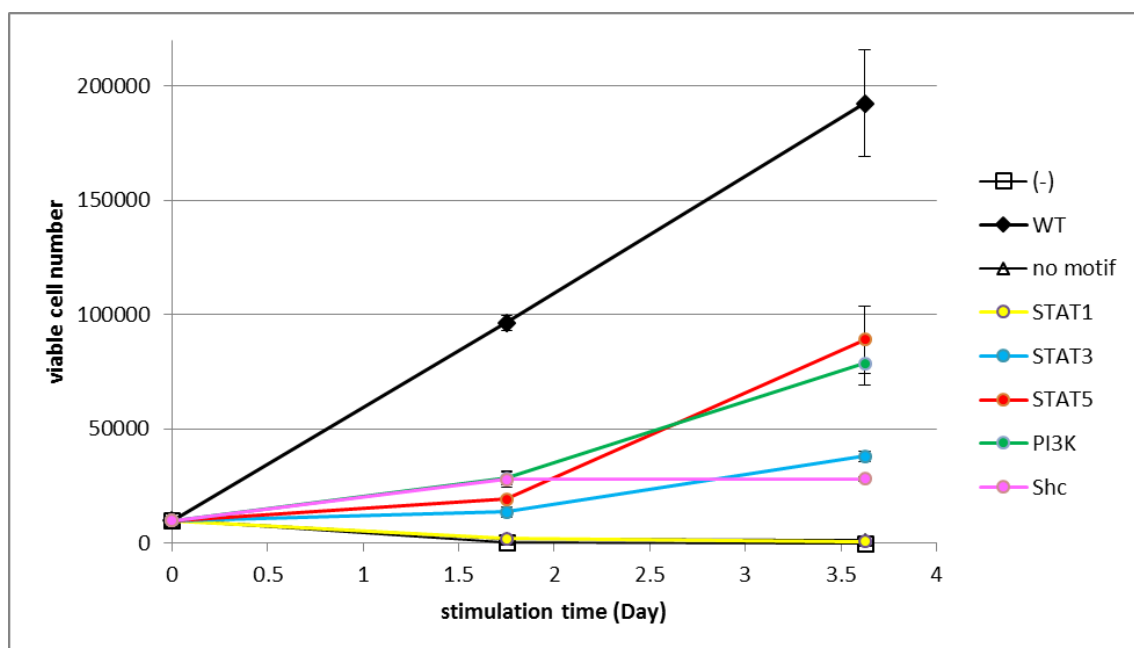


Fig.3-7 Ba/F3 増殖アッセイ 初期細胞数 10000 cells/well、n=3, 各日に FACS Calibur で細胞数を測定した。細胞数は mean±SD で示す。

3.4 考察

本研究よりチロシンモチーフをベースに受容体の細胞内ドメインを再構成することで、望みのシグナル伝達蛋白質を活性化できることが示された。

本研究では受容体細胞内ドメインの鋳型として c-Mpl を利用した。c-Mpl は I 型サイトカイン受容体のなかでも細胞内ドメインが比較的短く、また各領域の役割が明らかであるためエンジニアリングのベースとなる受容体構造として適しているといえる。

キメラ受容体に融合するチロシンモチーフの長さは既往の報告を参考に 10 アミノ酸残基程度に設定した。報告事例の多いチロシンモチーフのコンセンサス配列は 4 アミノ酸残基程度であったが[26, 30]、さらに周辺の配列も特異性に寄与している可能性を考慮した。実際に NPXY モチーフと分類される各種チロシンモチーフがその周辺配列により特異性を変え得ることが Smith らより示されている[31]。

本研究では5種類のチロシンモチーフを融合した各受容体のシグナル伝達活性を評価した。個々の受容体の特徴を確認すると、no motifの受容体でもリガンド依存的なSTAT5の活性化が確認された。これはJAK2にSTAT5が直接相互作用することでチロシンモチーフ非依的にSTAT5がリン酸化されたためであると考えられる(Fig.3-8)[95]。Ba/F3細胞への増殖効果がno motifと比較しSTAT5結合モチーフを有する細胞で高いことも、チロシンモチーフとJAK双方を経由することによるSTAT5の大きい活性化強度に起因している可能性がある。また、本試験において評価されていないシグナル伝達蛋白質をSTAT5結合モチーフが活性化している可能性もあると考えられる。

(Fig. 3-8は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.3-8 JAK依存的なSTAT5の活性化メカニズム[95] STAT5はJAKのJH2ドメインに結合しJAKによりリン酸化修飾される。

またSTAT1結合モチーフを有する受容体はBSA-FL非依的に各シグナル伝達蛋白質を活性化した。特にSTAT1ではIL-3刺激条件やWT受容体のBSA-FL刺激条件と比較しても顕著に強いリン酸化が確認された。JAKのリン酸化が示す受容体自体の活性化においてはリガンド依存性を示していることから、各シグナル伝達蛋白質において確認されるリガンド非依的な活性化は、検出限界以下の微弱な受容体の活性化に促された長期にわたるリン酸化修飾の蓄積によるものであり、それがSTAT1結合モチーフにおいて特に顕著である理由として、モチーフ自体のリン酸化レベル、または、モチーフとシグナル伝達蛋白質間の相互作用が他のモチーフと比べて強い可能性が考えられた。また、STAT1結合モチーフ受容体発現細胞では、STAT1の発現自体も亢進していることから、STAT1のリン酸化によりSTAT1の発現が上昇するというSTAT1シグナルにおけるポジティブフィードバック機構が働いたと考えられた[96]。

またSTAT1結合モチーフを有する遺伝子導入細胞はリガンド依的な細胞増殖を示さなかった。STAT1結合モチーフでは、前述の結果から細胞内蛋白の発現プロファイルの強い変化が確認されているため、細胞が正常な機能を保てない可能性が考えられた。

本技術は複雑なシグナル伝達のネットワークを一からデザインする合成生物学アプローチの一つとして位置付けることができるが、このような生物システムを再構成する技術は、様々な機能の解明手段として広く利用されている。細胞膜[97, 98]、代謝経路[99, 100]、遺伝子翻訳[101]、細胞周期[102-104]などの解明がその例として知られている。このようなアプローチは分子間ネットワークの定量的な解析や生物システムが正常に機能するための必要条件を明らかにするうえで非常に有効であり、本研究により構築したキメラ受容体も様々なシグナル伝達メカニズムの機能解明に役立つ可能性がある。

天然の受容体にはチロシンモチーフによる細胞内伝達シグナルの活性化以外にも様々な機構が備わっている。例えばc-Mplは二つのLLモチーフによりリガンド依的な受容体

の内在化が起こることが知られている[105]。また K553、K573 はユビキチン化されることで c-Mpl の分解を促進する働きがある[93]。本研究により構築された受容体では、このような影響を極力排除することができるため、望みの機能のみを追加することができる利点がある。

4. 異なるチロシンモチーフを利用したキメラ受容体による複数のシグナル伝達蛋白質の同時活性化

4.1 研究背景

前章ではチロシンモチーフをキメラ受容体に導入することで、モチーフの配列依存的にシグナル伝達経路の活性化パターンを変えることができることを示した。4章ではこの知見を応用し、キメラ受容体で複数のシグナル伝達蛋白質を同時に変えることができるか検証した。

天然の受容体は、その細胞内ドメインに複数のチロシンモチーフを有しているため、それぞれのモチーフに由来する異なるシグナル伝達蛋白質を活性化することができる。また1種類のチロシンモチーフからさえ、複数のシグナル伝達蛋白質を活性化することが可能である。例えば Type III 受容体型チロシンキナーゼであり SCF をリガンドとして認識する c-kit に含まれる Y567 のチロシンモチーフは、Src family kinase[106, 107]、SHP-2[108]、Shc[109, 110]を活性化することが知られている。

このような複数のシグナルによるクロストークは、細胞の運命を制御するうえで重要な役割を果たしている。例えば TGF- β は胚発生や恒常性の維持、さらには様々な疾患の病因として関与しているが、これは RAS/MAPK、PI3K/Akt、Wnt 経路など複数のシグナル伝達経路の相乗的な活性化によって制御されている[75]。また炎症反応において TNF- α は IFN- γ または IL-1 β とともに繊維芽細胞のケモカイン遺伝子の発現を協調的に促している[111]。このようなメカニズムに基づき、様々なサイトカイン刺激の相乗効果は、特定の細胞培養や組織工学において有用な働きを示すと考えられた。実際、SCF、TPO、Flt3 リガンド、IL-3 の組み合わせは、効率的に造血幹細胞の増殖を促すことが知られている。一方、望む細胞の運命を制御するうえでは、活性化できるシグナルがその細胞に発現する受容体由来に限定されること、また望まないシグナルも活性化されることが課題であった。

上記の課題に対して、モチーフエンジニアリングにより構築したキメラ受容体においては、複数のチロシンモチーフを一つの受容体に融合することで上記の制御が達成できると考えられたため、この章ではその可能性の検証を試みた。つまり複数のチロシンモチーフをキメラ受容体に導入し異なるシグナル伝達蛋白質を同時に活性化できるか検証した。また、複数のモチーフを受容体に導入するにあたって、各モチーフの1次構造上の位置とシグナル伝達蛋白質の活性との関係について考察した。さらに受容体が直接活性化できるシグナル伝達蛋白質からリン酸化カスケード下流のシグナル伝達蛋白質にまでシグナルを伝達でき、転写活性化まで達成できるか検証した。最後に複数のシグナルを同時に活性化することによる細胞機能への影響を Ba/F3 細胞の増殖作用を指標に評価した。

4.2 実験方法

ベクター構築

pGCDNsam HA-Smpl_{t69}-no_motif-I/E または pGCDNsam-HA-Smpl_{t69}-(STAT3, Shc, Mpllinker, G₄Slinker)-I/E を 2 章と同様の手法で構築した(Table 4-1)。上記ベクターから、さらに複数のチロシンモチーフ及びリンカーを挿入する際には、各チロシンモチーフ及びリンカーをコードする塩基配列と両端に *Mlu*I、*Bss*HIII サイトを含むオリゴヌクレオチドセットをアニーリングしてインサート遺伝子を調製した(Table 4-2)。Mpl リンカーの遺伝子は pGCDNsam-HA-S-Mpl-I/E から PCR で増幅し、*Bam*HI、*Eco*RI を用いて pUC119 に挿入した(Table 4-3)。さらに *Mlu*I、*Bss*HIII を用いて Mpl リンカーのインサート遺伝子を調製した。*Mlu*I で制限酵素処理したベクターへインサート遺伝子を挿入することで、あらかじめ組み込まれたモチーフ及びリンカーの上流に遺伝子を挿入した。オリゴヌクレオチド 2 本鎖の 3'側は、挿入後 *Mlu*I 認識サイトではなくなるよう設計されているため、複数のチロシンモチーフ及びリンカーをコードしたオリゴヌクレオチドは人工蛋白質の C 末端側から順番に連結できる。

Table 4-1 モチーフ遺伝子付加用オリゴヌクレオチド

STAT1 binding motif sense	cgcggtgccacctcctttggttatgataaaccacatgtgctatgag
STAT1 binding motif antisense	gacctcatagcacatgtggttatcataaccaaggaggtgggca
STAT3 binding motif sense	cgcggtggtgtacacagtggtacagacaccaagttccgctcatgag
STAT3 binding motif antisense	gacctcatgacggaacttggtgtctgtagccactgtgtaccacca
STAT5 binding motif sense	cgcggtgcttatggacaatgcctacttctgtgaggcagattgag
STAT5 binding motif antisense	gacctcaatctgcctcacagaagtaggcattgtccataagca
PI3K binding motif sense	cgcggtgcctctgcctccaagctatgtggcttgcctcttgag
PI3K binding motif antisense	gacctcaagagcaagccacatagcttgaggcagaggca
Shc binding motif sense	cgcggtgatccctgtcattgaaaatccccagctactttggcatctgag
Shc binding motif antisense	gacctcagatgccaagtagctggggattttcaatgacagggatca
G ₄ S linker sense	tcgagcggtggaggcggttcaggcggagggtggcagctga
G ₄ S linker antisense	gatctcagctgccacctccgctgaaccgctccaccgc

Table 4-2 モチーフ遺伝子付加用オリゴヌクレオチド (複数のモチーフを有する受容体)

STAT3 binding motif sense	cgcggtggtgtacacagtggtacagacaccaagttccgctcaggc
STAT3 binding motif antisense	cgcgccctgacggaacttggtgtctgtagccactgtgtaccacca
Shc binding motif sense	cgcggtgatccctgtcattgaaaatccccagctactttggcatcggc
Shc binding motif antisense	cgcgccgatgccaagtagctggggattttcaatgacagggatca
G ₄ S linker sense	cgcggtggtggaggcggttcaggcggagggtggcagcggcggtggcgggtcg

G4S linker antisense	cgcgcgacccgccaccgccgctgccacctccgctgaaccgctcca ccca
STAT3 binding motif (Y to F) sense	cgcgtggtggtacacagtggttcagacaccaagtccgcatga g
STAT3 binding motif (Y to F) antisense	gacacctcatgacggaacttggtgtctgaagccactgtgtaccacca

Table 4-3 Mpl リンカー付加用オリゴヌクレオチド

Mpllinker sense	gggggatccacgcgtgtgcctggggaccatgccctg
Mpllinker antisense	ggggaattcgcgcgcgtggcaatgtgggtggtacagcaggacc

各遺伝子の塩基配列は 2 章と同様の手法で実施した。

細胞株

リポフェクション

レトロウイルストランスダクション

フローサイトメーターによる EGFP 発現細胞の検出

フローサイトメーターによるキメラ受容体発現量の確認

Ba/F3 細胞増殖アッセイ

2 章と同様の手法で実施した。

ウエスタンブロッティング

2 章と同様の手法で実施した。ウエスタンブロッティングに使用した 1 次抗体は Table4-4 のとおりである。

Table 4-4 ウエスタンブロッティング用抗体

抗体名	製造元	型番	希釈率
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	#9145L	1:2000
STAT3 (C-20) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	sc-482	1:1000
p-Shc (Tyr239/240)-R	Santa Cruz	sc-18074-R	1:1000
Shc (H-108)	Santa Cruz	sc-1695	1:1000
Anti-ACTIVE MAPK pAb Rabbit (pTEpY)	promega	V803A	1:2500
ERK1(k-23)	Santa Cruz	sc-94	1:1000
Rabbit-anti HA affinity purified 0.1ml at 1 ng/ml	BETHYL	A190-108A-2	1:1000
β -tubulin (H-235) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	sc-9104	1:1000
HRP 標識 goat anti-Rabbit IgG	Biosource	ALI3404	1:4000

RT-PCR

5×10⁶ cells の細胞を 12 時間 RPMI1640 (+)で培養後、3×10⁶ cells を RPMI1640 (+)または RPMI1640 (+) + 1 µg/ml BSA-FL 4 ml に懸濁し、6 cm dish に播種し 6 時間培養した。RNeasy Mini kit(QIAGEN)の製品プロトコルに従い RNA を抽出した。PrimeScriptII 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ)または TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 の製品プロトコルに従い cDNA を合成した。

PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara) の製品プロトコルの反応組成に従い、プライマー終濃度 0.2 µM, cDNA 2 ng, SYBR GreenI Nucleic Acid Gel Stain (原液濃度 20 mM, invitrogen) 終濃度 2 µM を 20 µl スケールで混合し、7500Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) により PCR を行った(Table 4-5)。Pim-1 の Ct 数を GAPDH の Ct 数で規格化した後、Parental Ba/F3(BSA-FL 未刺激)での値を 1 とおいて $\Delta\Delta Ct$ 法により解析した。

Table 4-5 RT-PCR プライマー

Pim-1 sense	CGCGACATCAAGGACGAGAACA
Pim-1 antisense	CGAATCCACTCTGGAGGACTGT
HPRT1 sense	GAGGAGTCCTGTTGATGTTGCCAG
HPRT1 antisense	GGCTGGCCTATAGGCTCATAGTGC

4.3 実験結果

まず初めに、複数のモチーフを受容体に組み込む準備として、モチーフ間をつなぐ役割を果たす適切なペプチドリンカーの選定と、モチーフの配置場所が異なることによるシグナル伝達能への影響を検証した。

本章においてもキメラ受容体のベースには S-Mpl (no motif)を利用した。モチーフ間の接続するペプチドリンカーとして、c-Mpl 細胞内ドメインの JAK 結合領域より下流に存在するおよそ 30 残基の配列 (Fig. 2-2B, Mpl リンカー) に着目した。この配列はチロシン残基を含まないためシグナル伝達蛋白質が結合せず、天然の受容体に由来する配列であるため、受容体の細胞内ドメインとして必要な構造の柔軟性を有すると予想された。Mpl リンカーを S-Mpl の JAK 結合領域の直後に 1 つまたは続けて 2 つ融合し、その直下に先述の 5 種類のチロシンモチーフを融合した受容体を構築した(Fig. 4-1)。

構築したキメラ受容体発現ベクターを Ba/F3 細胞に遺伝子導入し 90%以上の EGFP 陽性率を示す遺伝子導入細胞を得ることに成功した(Fig.3-3, linker 1, 2)。また各受容体が細胞膜に発現していることを確認した(Fig. 3-4A, linker 1, 2)。

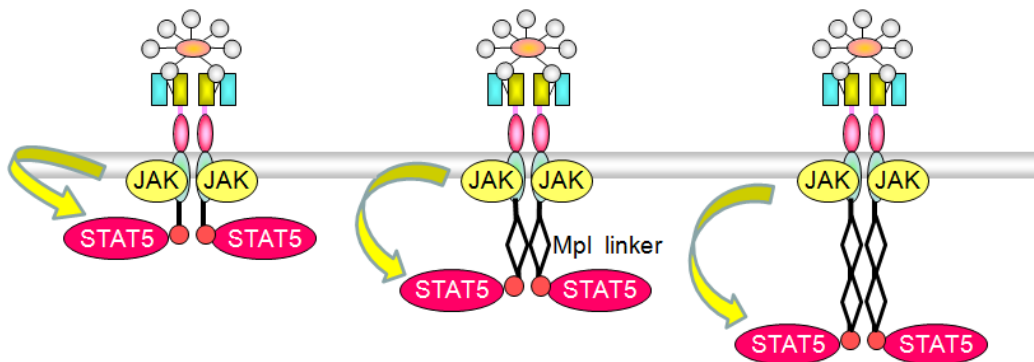


Fig. 4-1 リンカー挿入キメラ受容体概念図 Mpl linker を JAK 結合ドメインとチロシンモチーフの間に一つまたは二つ挿入される。

つぎに各シグナル伝達分子の活性化とその強度をウエスタンブロットにより検証した。その結果、各モチーフが標的とするシグナル伝達蛋白質を中心に、各受容体はリンカーを含まない受容体と同様のシグナル伝達蛋白質活性化パターンを示すことが確認された (Fig.4-2, 4-3)。異なる点としてリンカーを 2 つ導入した受容体では、STAT5 の活性化が STAT3、PI3K、Shc 結合モチーフ受容体では比較的弱いこと、STAT1 結合モチーフを有する受容体ではリガンド依存性が改善されたことが挙げられる。従ってモチーフの配置場所によりモチーフ依存的な活性化パターンに変動がないこと、また Mpl リンカーに直接シグナル伝達蛋白質を結合する能力はなく、付加したモチーフの特性に大きな影響を与えないことが確認された。

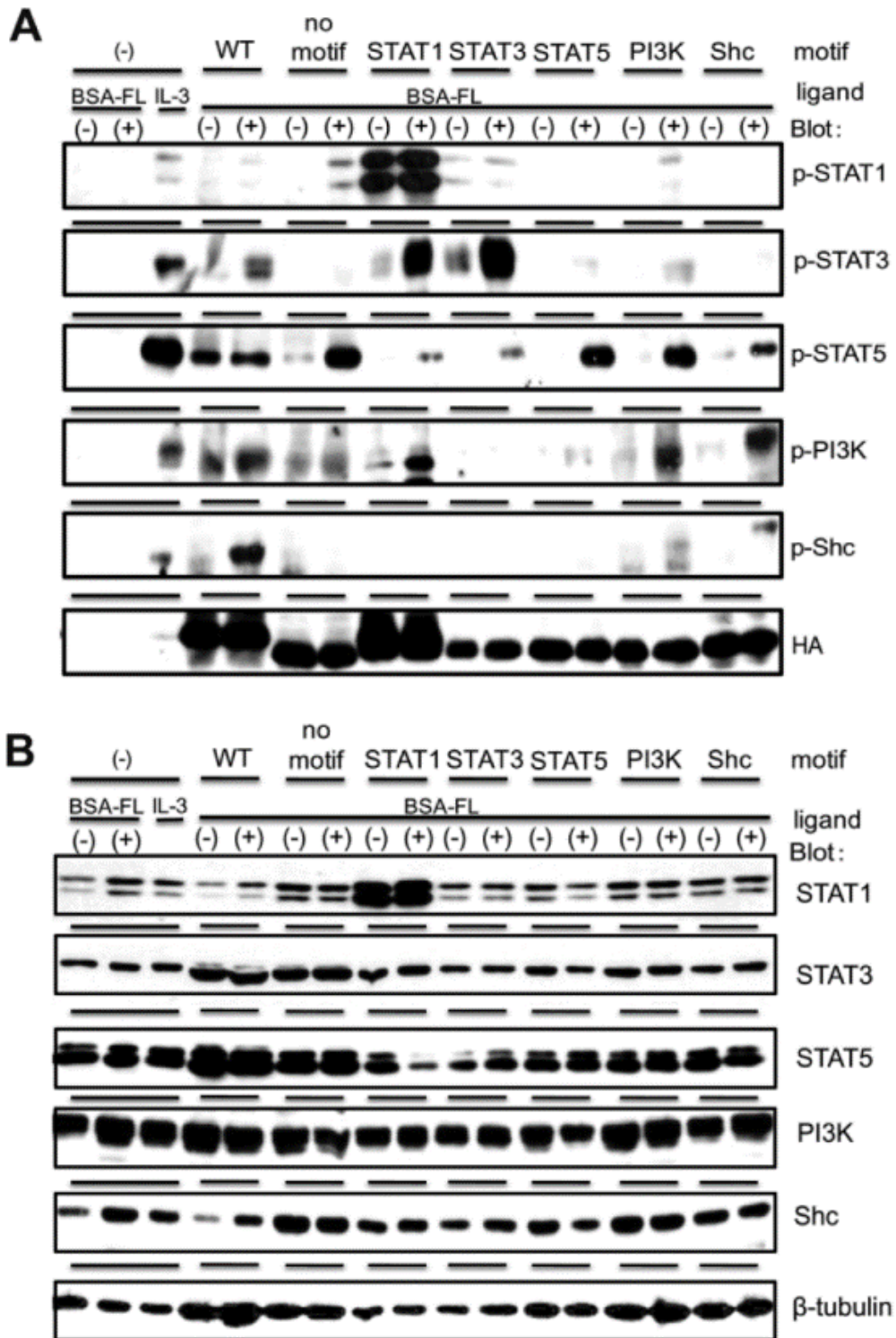


Fig. 4-2 Mpl リンカーを一つ挿入した受容体によるシグナル伝達蛋白質の活性化 A) ウエスタンブロッティングによるリン酸化シグナル伝達蛋白質の検出 B) ウエスタンブロッティングによるシグナル伝達蛋白質発現量の比較 BSA-FL(1 μ g/ml)、IL-3(1 ng/ml)、15 分間リガンド刺激

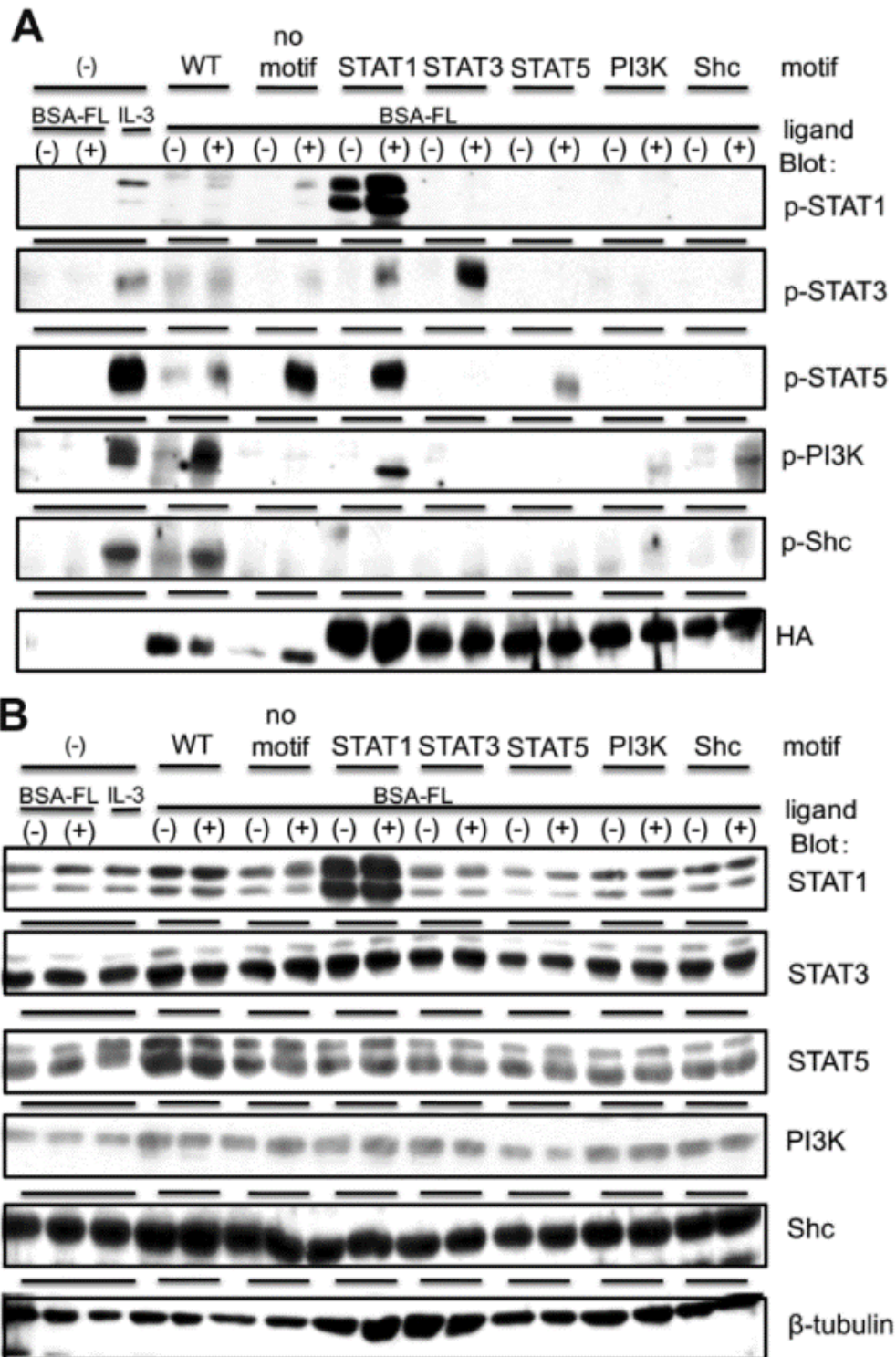


Fig. 4-3 Mpl リンカーを二つ挿入した受容体によるシグナル伝達蛋白質の活性化 A) ウエスタンブロッティングによるリン酸化シグナル伝達蛋白質の検出 B) ウエスタンブロッティングによるシグナル伝達蛋白質発現量の比較 BSA-FL(1 μ g/ml)、IL-3(1 ng/ml)、15 分間リガンド刺激

つぎにシグナルの定量的な強度における JAK とモチーフ間の距離依存性を調べるために、リンカー数の異なる各モチーフについて目的とするシグナル伝達蛋白質の活性化強度をウエスタンブロッティングにより比較した (Fig. 4-4)。

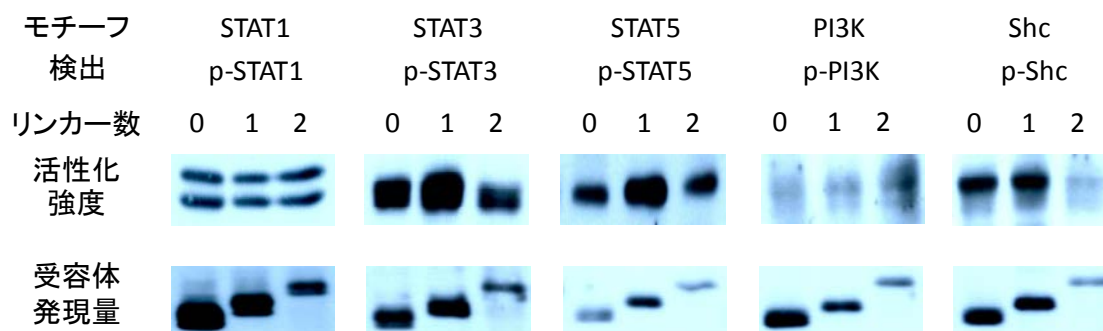


Fig. 4-4 リンカー数に対するシグナル伝達分子活性化強度の比較 受容体の発現量は抗 HA 抗体により検出した。 BSA-FL(1 μ g/ml)、15 分間リガンド刺激

その結果、リンカー挿入による活性化強度の増減は、キメラ受容体の発現量と強く相関し、この相関関係より優位な JAK-モチーフ間の距離に依存する影響は確認されなかった。STAT1 の活性化強度は他のシグナル伝達蛋白質と比較し、発現量に対する依存性が弱い。これはこのリン酸化レベルで十分に細胞内の STAT1 の活性化強度が飽和しているためであると考えられる。また全ての種類のモチーフ融合受容体について、リンカーを 2 つ挿入するとそれ以下に比べ発現量の低下が確認された。

Mpl リンカーを複数挿入することによる発現量低下の影響を抑制するため、別種のペプチドリンカーとして、柔軟な構造を有することが知られ広く蛋白質工学に用いられている G₄S リンカーの利用を試みた[112, 113]。G₄S リンカーがモチーフ配列に起因するシグナルに影響を与えないことを示すため、Shc 結合モチーフを有する受容体に Mpl リンカー、(G₄S)₃ リンカーをそれぞれ挿入し、BSA-FL 刺激時のシグナル伝達蛋白質の活性化を検証した(Fig. 4-5)。その結果、どちらのリンカーにおいても、リンカー未挿入時と同様のシグナル伝達蛋白質を活性化できることが示された(Fig. 4-6)。

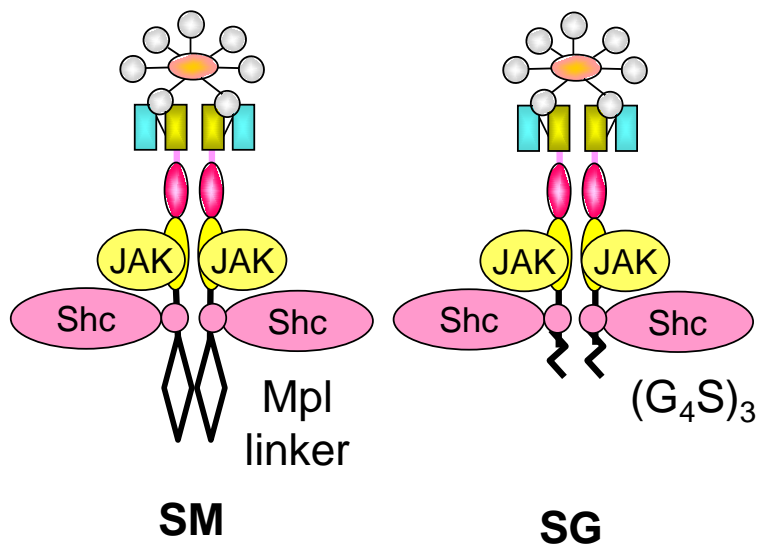


Fig. 4-5 リンカーを導入したキメラ受容体構造 Shc 結合モチーフの後ろに Mpl linker または G₄S リンカーを挿入する。

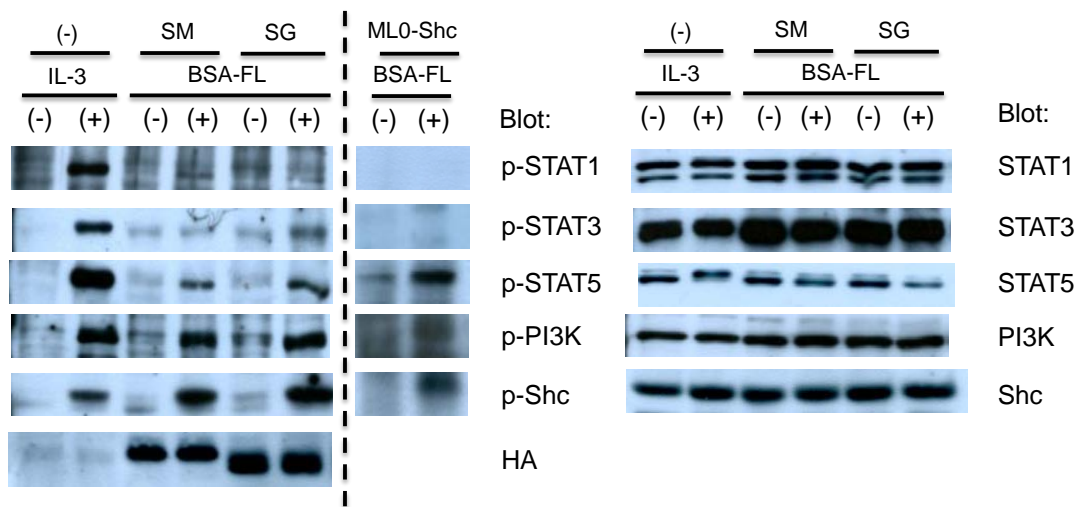


Fig. 4-6 キメラ受容体によるシグナル伝達蛋白質活性化に対するリンカー配列の影響
BSA-FL : 1 μg/ml, IL-3 : 1 ng/ml, 15 分間刺激

つぎに G₄S リンカーを有する受容体を用いて、シグナルの JAK とモチーフ間の距離依存性を定量的に調べるために、STAT3 結合モチーフの上流に (G₄S)₃、(G₄S)₆、(G₄S)₉ を挿入した受容体 (G₃, GG₃, GGG₃ と呼ぶ) を構築した。これら受容体の発現量を、抗 HA 抗体を用いてフローサイトメーターまたはウエスタンブロットで検証したところ、リンカーを持たない受容体と比べ、その発現量差は 0.9 倍から 1.2 倍であった (Fig. 5-4、次章に掲載)。また発現量の増減はリンカーの個数と関連しなかった。従って、Mpl リンカーと比較し G₄S

リンカーはその長さによらず受容体の発現量に大きな影響を与えないことが示された。

つぎに各受容体のリガンド刺激時における STAT3 のリン酸化量を比較した(Fig. 4-7)。その結果、すべての受容体について BSA-FL 濃度依存的な STAT3 の活性化を確認することができた。各受容体のシグナル強度を比較すると、リンカーを有していない受容体(3)と比較し、それぞれ、およそ 0.8 倍(G3)、1.5 倍(GG3)、1.3 倍(GGG3)の値を示し、リンカーの長さに依存した顕著なシグナル強度の増減は確認されなかった。以上のことから G₄S リンカーは Mpl リンカーと比較し、受容体の発現量やシグナル強度に大きな影響を与えないことが示された。従って以降の研究ではリンカーとして G₄S リンカーを利用することとした。

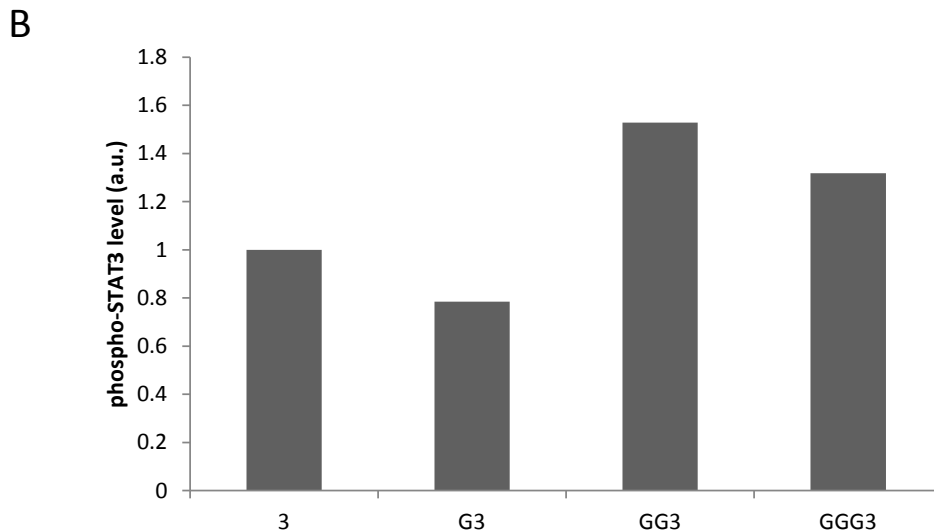
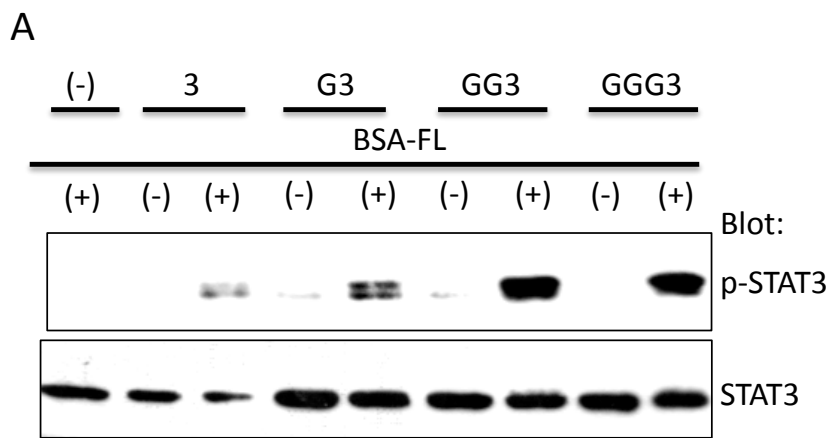


Fig. 4-7 G₄S リンカー長に対するシグナル伝達分子活性化強度の比較

A) ウェスタンブロット結果 リガンド刺激時間：15 min、BSA-FL 濃度：1 μ g/ml B) Image J による定量結果 p-STAT3 量を STAT3 の発現量、受容体の表面発現量で規格化し、キメラ受容体「3」(+BSA-FL)を 1 とした。

つぎに異なる種類のモチーフを一つの受容体に融合することで、異なるシグナル伝達蛋白質を同時に活性化できるか検証した。利用するチロシンモチーフとして、STAT3 結合モチーフと Shc 結合モチーフを利用した。これらのモチーフは互いが標的とする蛋白質を活性化しないことが Fig. 3-6 の結果から示されている。

まず Shc 結合モチーフの直下に STAT3 結合モチーフを挿入した受容体を構築した(S3)。また二つのモチーフ間の距離が活性化シグナル強度に与える影響を検証するため、その間に(G₄S)₃ リンカーを挿入した受容体(SG3)、(G₄S)₉ リンカーを挿入した受容体(SGGG3)を構築した。また S3 の STAT3 結合モチーフのチロシン残基をフェニルアラニンに置換することで STAT3 結合能を失わせた受容体(S3YF)を構築した。比較対象として、Shc 結合モチーフのみ、または STAT3 結合モチーフのみをもつ受容体(それぞれ SG, G3)を構築した(Fig. 4-8)。

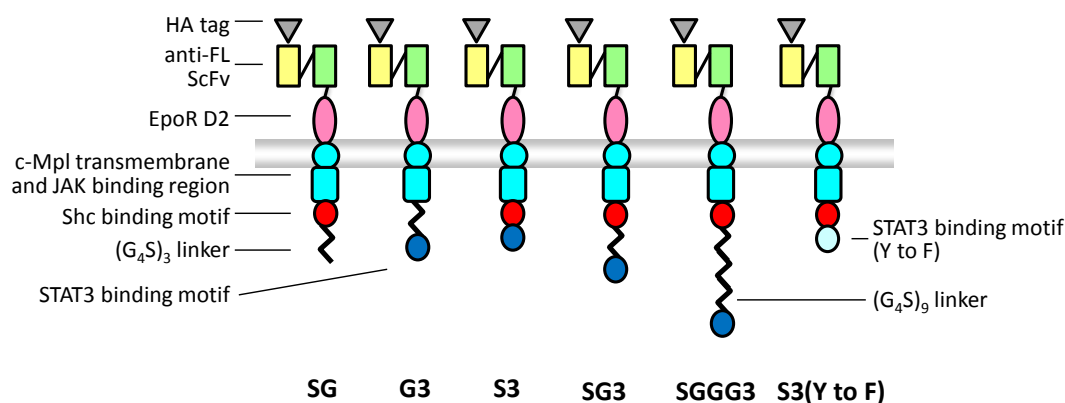


Fig. 4-8 複数の結合モチーフを有するキメラ受容体構造

以上のキメラ受容体を Ba/F3 細胞に遺伝子導入し EGFP 陽性細胞をフローサイトメーターにより単離することで遺伝子導入細胞を得た。遺伝子導入細胞の割合を EGFP 陽性率を指標に評価したところ、すべての細胞が 95%以上の EGFP 陽性率を示した。(Fig.4-9)

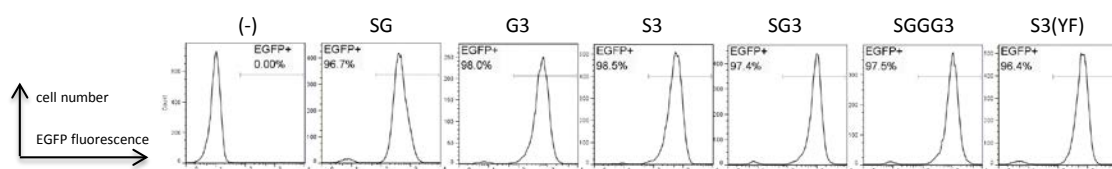


Fig. 4-9 遺伝子導入率 EGFP の蛍光強度の細胞数ヒストグラムを示す。

また、各キメラ受容体の発現を、抗 HA 抗体を用いてフローサイトメーターとウェスタンブロッティングにより検証した(Fig. 4-10)。その結果、全てのキメラ受容体が細胞膜表面に全長で発現していることが確認された。

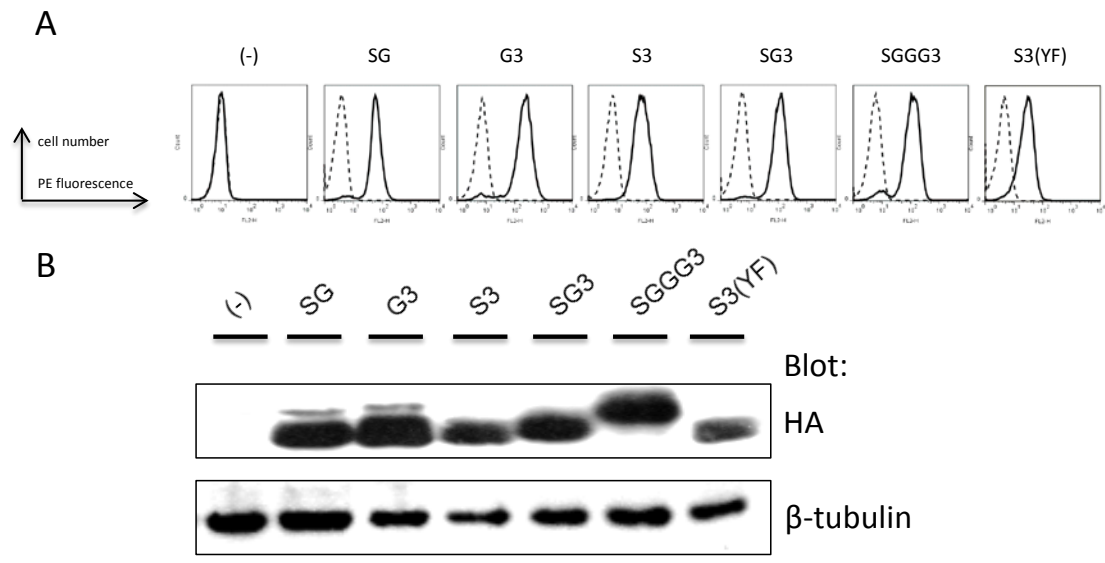


Fig. 4-10 受容体の発現量
 A) フローサイトメーターによるキメラ受容体発現確認 Dash:PBS, Solid: anti-HA. 横軸はPE 蛍光強度、縦軸は細胞数を表す。 B) ウェスタンブロッティングによるキメラ受容体発現確認

つぎに、構築したキメラ受容体が標的とするシグナル伝達蛋白質を活性化するかウェスタンブロッティングにより検証した(Fig. 4-11)。その結果、SG や G3 は標的とするシグナル伝達蛋白質のみをそれぞれ活性化する一方、2つのモチーフを組み込んだすべての受容体において STAT3 と Shc のリン酸化を確認することができた。また S3 ではモチーフ間にリンカーを挿入した受容体と比較し、STAT3 と Shc の活性化強度が弱かった。このことから、モチーフが近接することで複数のシグナル伝達蛋白質がモチーフへ競合的に結合している、またはモチーフの性質が変化している可能性が考えられた。

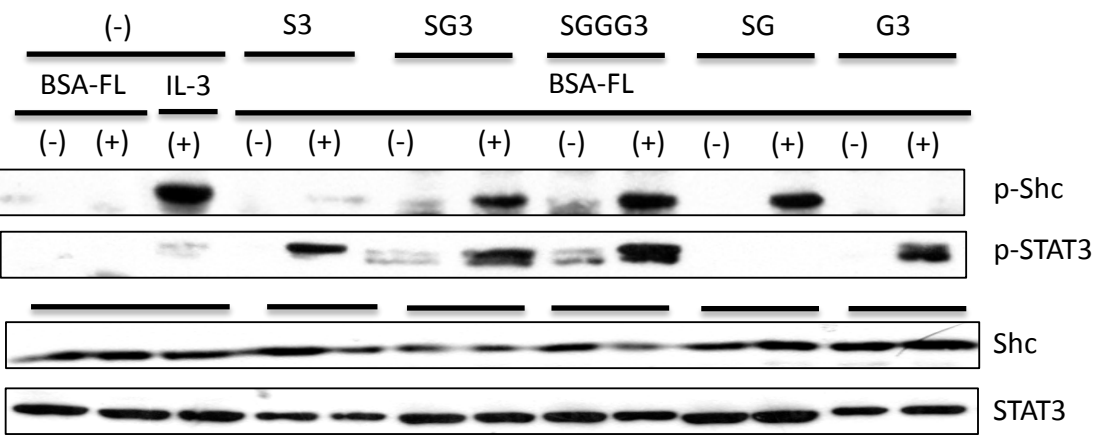


Fig. 4-11 ウェスタンブロットによる Shc, STAT3 のリン酸化レベルの検証
 BSA-FL : 1 µg/ml, IL-3 : 1 ng/ml, 15 分間刺激

この原因を究明するため、S3 について STAT3 の結合モチーフのチロシンをフェニルアラニンに置換し STAT3 への結合能を失わせた受容体(S3YF)において、Shc の活性化強度が回復するかどうかを検証した(Fig. 4-12)。

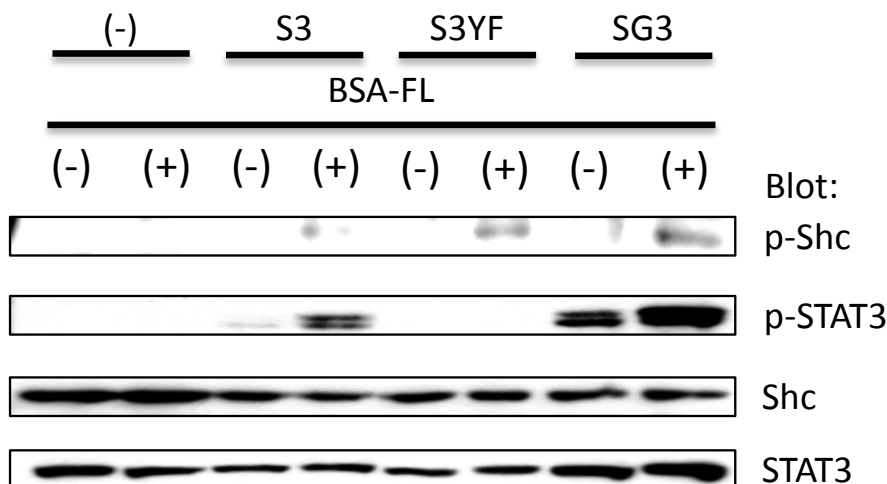


Fig. 4-12 ウェスタンブロットによる Shc, STAT3 のリン酸化レベルの検証
BSA-FL : 1 μ g/ml, 15 分間刺激

その結果、STAT3 結合モチーフに変異を加えることで STAT3 のリン酸化が完全に抑制されることを確認した。また、それとともに Shc の活性化強度がモチーフ間にリンカーを挿入した SG3 に匹敵するレベルまで回復した。S3YF と S3 で一次構造は非常に類似しているため、近接するモチーフにより、もう一方のモチーフの性質が変化しているとは考えにくい。従ってモチーフの近接は複数のシグナル伝達蛋白質の受容体への競合的な結合を促すことが示唆された。

つぎに、複数のシグナル伝達蛋白質の活性化による Ba/F3 細胞への機能制御の相乗効果を検証した。始めに標的とするシグナル伝達蛋白質のリン酸化によりシグナルカスケードの下流へ正しくシグナルを伝達できるか確認した。従って転写因子である STAT3 についてはその標的遺伝子である Pim-1 の mRNA 量を RT-PCR により測定、MAPK 経路の上流蛋白質である Shc については ERK のリン酸化をウェスタンブロットにより測定した。

その結果、Pim-1 の mRNA 量は、STAT3 結合モチーフを有する G3, SG3 において BSA-FL 刺激時に上昇した(Fig. 4-13)。また Erk のリン酸化レベルは、STAT3 結合モチーフを有する G3 では活性化されないのに対して、Shc 結合モチーフを有する SG, SG3 において同じく BSA-FL 刺激時に大きく上昇することを確認した(Fig. 4-14)。SG についても Pim-1 の mRNA 量が parental Ba/F3 細胞に比べ微弱ながら上昇しているが、これは JAK により活性化される STAT5 も STAT3 と同様に Pim-1 を転写活性化遺伝子としているためであると考えられる[114]。以上のことから両シグナル伝達蛋白質が下流へ正しくシグナルを伝達することが示された。

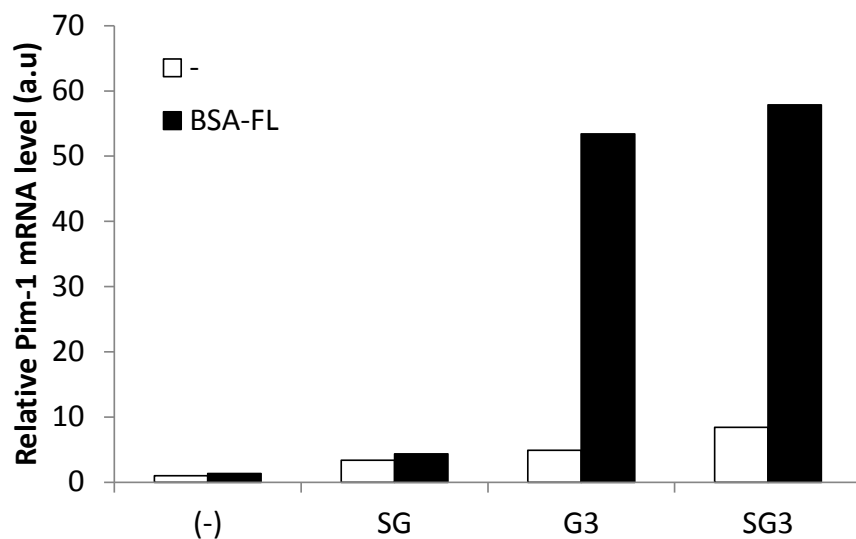


Fig. 4-13 Pim-1 の mRNA 量

Pim-1 の mRNA レベルを HPRT1 レベルで規格化し、parental Ba/F3 BSA-FL 未刺激を 1 とした $\Delta\Delta Ct$ により値を算出した。BSA-FL: 1 $\mu\text{g/ml}$, 6 時間刺激

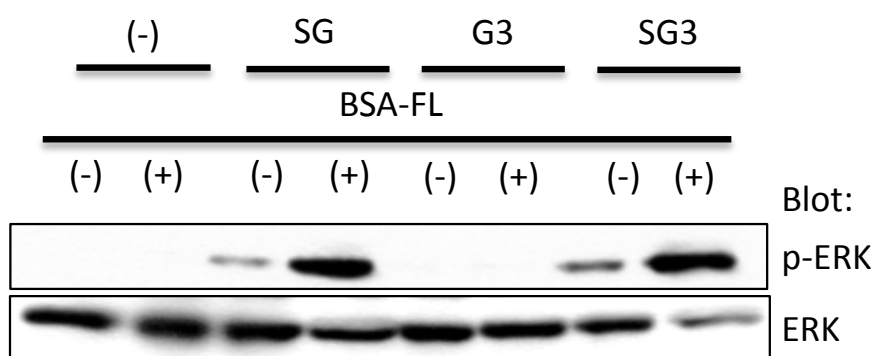


Fig. 4-14 ERK のリン酸化レベルの検証

BSA-FL: 1 $\mu\text{g/ml}$, 15 分間刺激

つぎに、各受容体発現細胞のリガンド刺激時の増殖能を比較した。STAT3、Shc とともに様々な細胞の増殖に強く関与することが知られている。リガンド刺激 2 日後に細胞数を測定した結果、シグナルのリークがやや強いが、すべての受容体発現細胞についてリガンド依存的な受容体の増殖促進効果を確認することができた。また Shc、STAT3 結合モチーフをともに有する受容体は単独のモチーフを有する受容体より強い増殖能を示すことが確認された(Fig. 4-15)。このことから Ba/F3 細胞の増殖において、複数シグナルの相乗効果を示すことが示唆された。

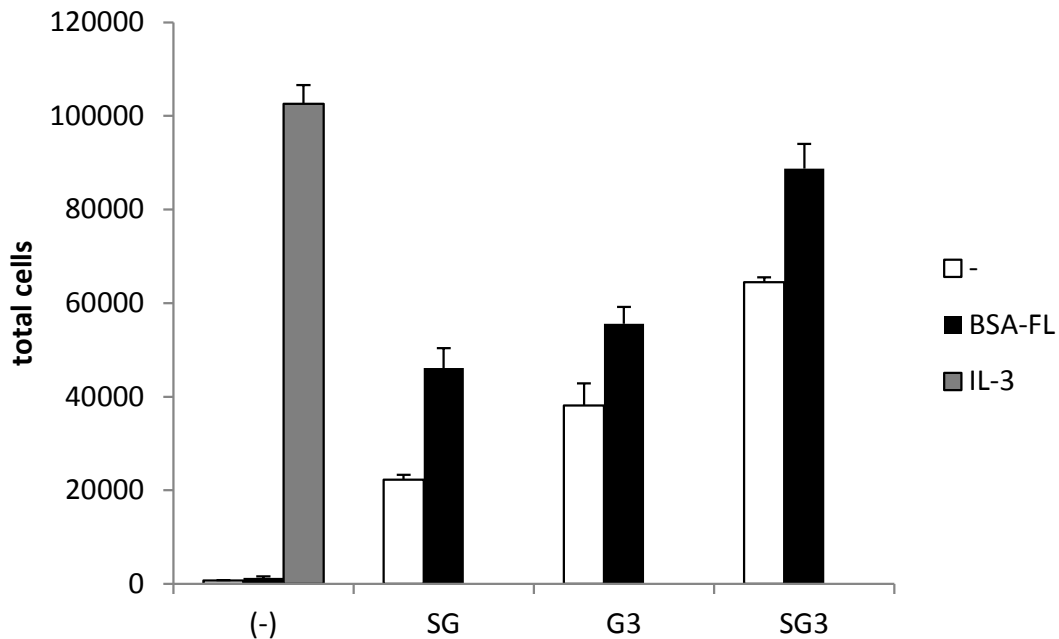


Fig. 4-15 増殖アッセイ

初期細胞数 10000 cells、n=3、BSA-FL 濃度 : 1 μ g/ml、IL-3 濃度 : 1 ng/ml、Day 2 に細胞数を FACS Calibur で測定、mean+SD で示す。

4.4 考察

以上の結果から、2種類のモチーフをキメラ受容体に導入することでそれぞれの由来のシグナルを同時に活性化できることが示された。また活性化されたシグナルは正しく下流経路に伝達され Ba/F3 細胞の増殖においてもその相乗効果を示すことに成功した。

リンカーについては受容体のシグナル伝達活性に影響せず、発現量に寄与する受容体の安定性を損なわない G₄S リンカーが本研究において評価した中では適していた。既往の報告から受容体細胞内ドメインの配向がシグナルの伝達強度に大きな影響を与えることが知られている[115]。G₄S リンカーにおける受容体発現量への影響はこの効果より弱く無視できるレベルであると考えられる。

本研究の検証には STAT3 と Shc を標的分子として利用した。これらに結合するモチーフを両方導入された SG3 と SGGG3 は単独のモチーフが活性化し得る STAT3 と Shc の活性化強度を示したことから、両分子のリン酸化イベントは独立して起こると考えられる。

本研究結果から、双方を活性化するうえで必要なモチーフ間のアダプター配列の必要性が明らかになった。2つのモチーフを直接つなぐと(チロシン残基間が10アミノ酸残基程度)、一方の活性化強度が減弱した。天然に存在する受容体においても近接した位置に2つのモチーフが存在する。例えば c-Mpl や c-kit はそれぞれ Y₆₂₆LPLSY₆₃₁WQQ、Y₅₆₈VY₅₇₀IDPT という配列を細胞内ドメインに有する。従ってこれらも単一モチーフとし

て機能する可能性が示唆される。一方、シグナル伝達蛋白質が有するチロシン残基結合ドメイン (SH2 ドメイン) を 1 分子で 2 つ含む蛋白質も存在する。チロシンフォスファターゼとして知られる SHP はその一つであり、immunotyrosine based inhibition motifs (ITIMs, コンセンサス配列 I/V/LXYXXL/V)には SHP が結合することが知られている[116-118]。従ってこのような分子の活性化にも構築したキメラ受容体は活用できる可能性がある。

様々な細胞は生存・増殖・分化など細胞の運命を制御するために、複雑な細胞内シグナル伝達ネットワークを必要としている [119, 120]。例えば Wnt/ β -catenin または PTEN/PI3K/Akt シグナル伝達経路の一方だけでは、HSC の自己複製や増殖には不十分であり、双方を同時に活性化した際の相乗効果が必要であることが知られている[121]。従って構築されたキメラ受容体はこのような精緻な細胞機能の制御に有用であると考えられる。

5. 複数のチロシンモチーフを利用したキメラ受容体によるシグナル伝達蛋白質の活性強度制御

5.1 研究背景

4章ではシグナル伝達経路の多様性の観点から、シグナルネットワークを制御できるシステムを構築した。本章ではシグナルの活性化を定量的な強度や時系列変化の観点から捉え、複雑なシグナルネットワークの制御を試みた。

シグナル伝達蛋白質の活性化メカニズムが遺伝子発現ネットワークのメカニズムと大きく異なる点として、イベントのタイムスケールが挙げられる。遺伝子発現は数時間単位で行われるのに対し、シグナルの活性化は数秒単位で起こる。翻訳後修飾に基づくイベントはエネルギー障壁の観点からもハードルが低く細胞内で高頻度に発生する。従って計算的な手法を用いたネットワーク予測も遺伝子発現機構と比較すると難しいと考えられる。

細胞内のシグナル伝達メカニズムの理解を困難にさせる原因の一つとして、シグナルの活性化強度や持続性が最終的なアウトプットに大きな影響を与えることがある。例えば IL-6 と IL-10 はともに STAT3 を活性化するが、その持続性が異なるためそれぞれ炎症促進作用と抗炎症作用という異なる作用を引き起こす[122]。

このようなシグナルネットワークのダイナミクスを人為的に制御する試みも複数報告されている(Fig.5-1)。Ingolia らは、シグナル伝達経路の上流で機能する分子の恒常活性型蛋白質をシグナル伝達経路下流で転写・翻訳されるようにデザインすることで、フィードバック機構により抑制を受けるべきシグナルネットワークを、一度の刺激から持続的に活性化できるよう制御することに成功した[123]。また Bashor らは付加的にシグナルネットワークの活性化を正または負に制御する蛋白質を発現制御することで、レオスタット型のスイッチ機構を導入することに成功している[124]。

(Fig. 5-1 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.5-1 シグナル強度や持続性を制御する分子機構[1] ポジティブフィードバック機構が働くとシグナルの活性化が持続する、または活性化に転じる閾値の前後で強度の上昇率が高くなることが知られている。

そこで本章では構築する受容体のコンストラクトにより、シグナルの定量的な強度を制御できるか検証した。具体的には STAT3 の結合モチーフを受容体に複数組み込むことで、その活性化強度を制御すること、さらには細胞内蛋白質が受容体に結合する際の動力学的メカニズムの解明を試みた。

5.2 実験方法

ベクター構築

pGCDNsam-HA-Smpl_{t69}-STAT3-I/E を 2 章と同様の手法で構築した(Table 5-1)。上記ベクターから、さらに複数のチロシンモチーフ及びリンカーを挿入する際には、各チロシンモチーフ及びリンカーをコードする塩基配列と両端に *Mlu*I、*Bss*HII サイトを含むオリゴヌクレオチドセットをアニーリングしてインサート遺伝子を調製した(Table 5-2)。さらに *Mlu*I、*Bss*HII を用いて G₄S リンカーのインサート遺伝子を調製した。*Mlu*I で制限酵素処理したベクターへインサート遺伝子を挿入することで、あらかじめ組み込まれたモチーフ及びリンカーの上流に遺伝子を挿入した。

Table 5-1 モチーフ遺伝子付加用オリゴヌクレオチド

STAT3 binding motif sense	cgcggtggtgtacacagtggtacagacaccaagttccgctcatgag
STAT3 binding motif antisense	gatcctcatgacggaacttggtgtctgtagccactgtgtaccacca

Table 5-2 モチーフ遺伝子付加用オリゴヌクレオチド (複数のモチーフを有する受容体)

STAT3 binding motif sense	cgcggtggtgtacacagtggtacagacaccaagttccgctcaggc
STAT3 binding motif antisense	cgcggcctgacggaacttggtgtctgtagccactgtgtaccacca
G ₄ S linker sense	cgcggtgggtggaggcgggttcaggcggaggtggcagcggcgggtggcgggtcg
G ₄ S linker antisense	cgcgcgacccgccaccgccgctgccacctccgctgaaccgctccacca

各遺伝子の塩基配列は 2 章と同様の手法で実施した。

細胞株

リポフェクション

レトロウイルストランスダクション

フローサイトメーターによる EGFP 発現細胞の検出

フローサイトメーターによるキメラ受容体発現量の確認

2 章と同様の手法で実施した。

ウエスタンブロッティング

2 章と同様の手法で実施した。ウエスタンブロッティングに使用した 1 次抗体は Table 5-3 のとおりである。

Table 5-3 ウエスタンブロッティング用抗体

抗体名	製造元	型番	希釈率
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology	#9145L	1:2000
STAT3 (C-20) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	sc-482	1:1000
Rabbit-anti HA affinity purified 0.1ml at 1 ng/ml	BETHYL	A190-108A-2	1:1000

β -tubulin (H-235) rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz	sc-9104	1:1000
HRP 標識 goat anti-Rabbit IgG	Biosource	ALI3404	1:4000

5.3 実験結果

STAT3 結合モチーフを受容体に複数導入することで、1 分子の受容体による STAT3 の活性化強度を向上できるか検証を試みた。構築した受容体は先述と同じく S-Mpl の JAK 結合ドメイン直下に STAT3 結合モチーフと G₄S リンカーを目的の位置に配置した構造である。具体的には JAK 結合ドメインと STAT3 結合モチーフの間にそれぞれ、(G₄S)₃、(G₄S)₆、(G₄S)₉ を挿入した G3、GG3、GGG3、また (G₄S)₃ を介して STAT3 結合モチーフを 2 つまたは 3 つつなげた 3G3、3G3G3、さらにリンカーを含まず直接 STAT3 結合モチーフを 2 つまたは 3 つ連結させた 33、333 を構築した(Fig. 5-2)。

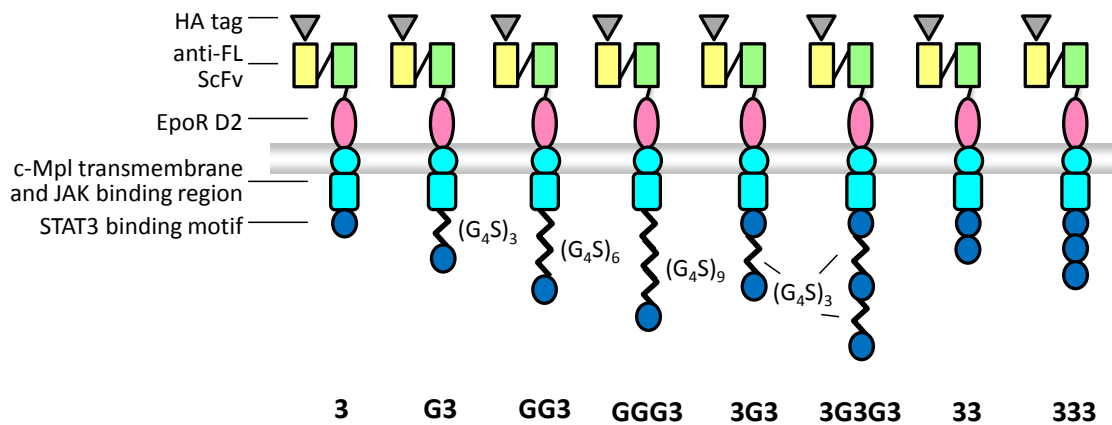


Fig. 5-2 同種のチロシンモチーフを複数有する受容体構造

以上のキメラ受容体を Ba/F3 細胞に遺伝子導入し EGFP 陽性細胞をフローサイトメーターにより単離することで、遺伝子導入細胞を得た(Fig. 5-3)。全ての遺伝子導入細胞は EGFP 陽性率が 95%以上であった。

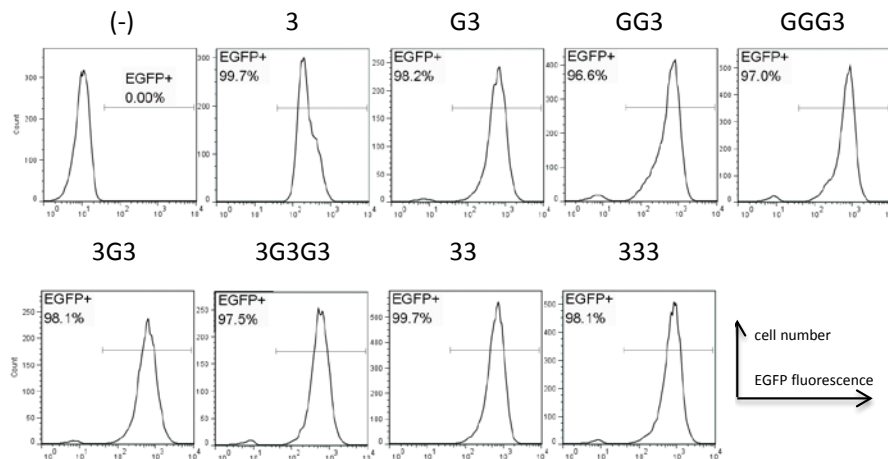


Fig. 5-3 遺伝子導入率 EGFP の蛍光強度の細胞数ヒストグラムを示す。

また、各キメラ受容体の発現をフローサイトメーターとウエスタンブロッティングにより確認した(Fig. 5-4)。その結果、全てのキメラ受容体が細胞膜表面に全長で発現していることが確認された。また 3G3G3 については他の受容体と比較し全長で存在する受容体の発現レベルが低いことが示された。Fig. 5-4 から、一次構造上同等の細胞内ドメイン長を有する SGGG3 では大きな発現量の減少が確認されていないため、3G3G3 における発現量減少は、必ずしも細胞内ドメインの配列長による影響によるものとはいえないと考える。

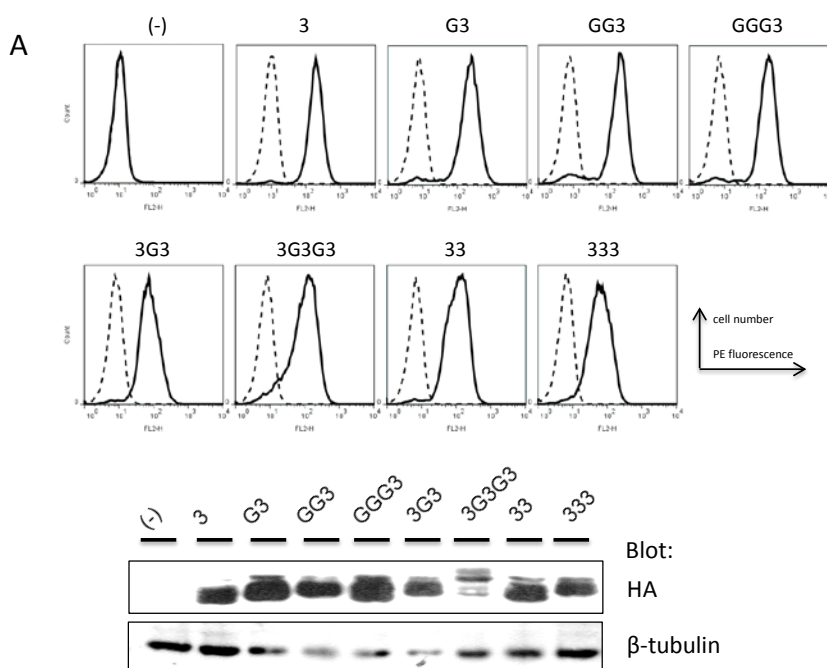


Fig. 5-4 受容体の発現量

A) FACSによるキメラ受容体発現確認 Dash:PBS, Solid: anti-HA 横軸はPE蛍光強度、縦軸は細胞数を表す。 B) ウエスタンブロッティングによるキメラ受容体発現確認

本研究ではまず、リガンド濃度に応じて受容体のシグナル強度を制御できること、またリガンド濃度制御により取り得るシグナル強度範囲を確認した。従って STAT3 結合モチーフを1つのみ有する受容体において STAT3 リン酸化の BSA-FL 濃度依存性を検証した(Fig. 5-5)。その結果、リガンド濃度依存的な受容体による STAT3 リン酸化量の増加が確認できた。また STAT3 のリン酸化を指標としたときの EC₅₀ は 0.1~1.0 μ g/mL の濃度域に存在し、10 μ g/mL 刺激条件における強度を最大活性としたとき、1.0 μ g/mL の濃度において 90%以上の活性を示した。

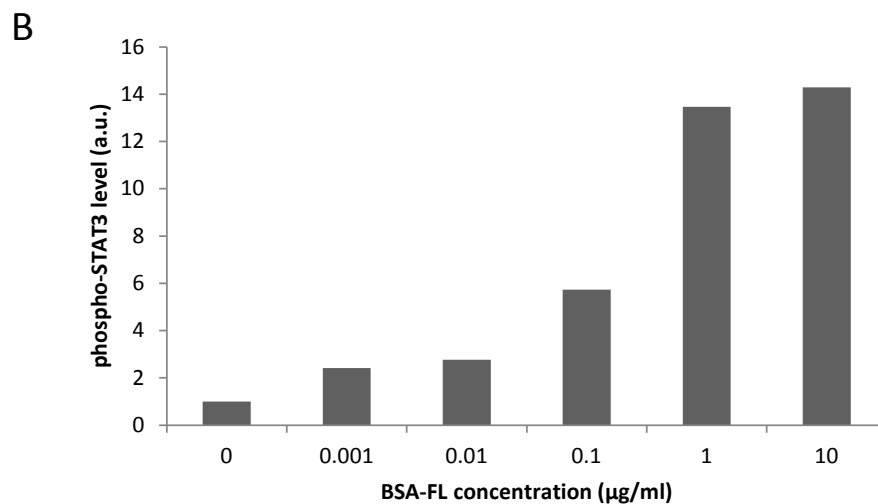
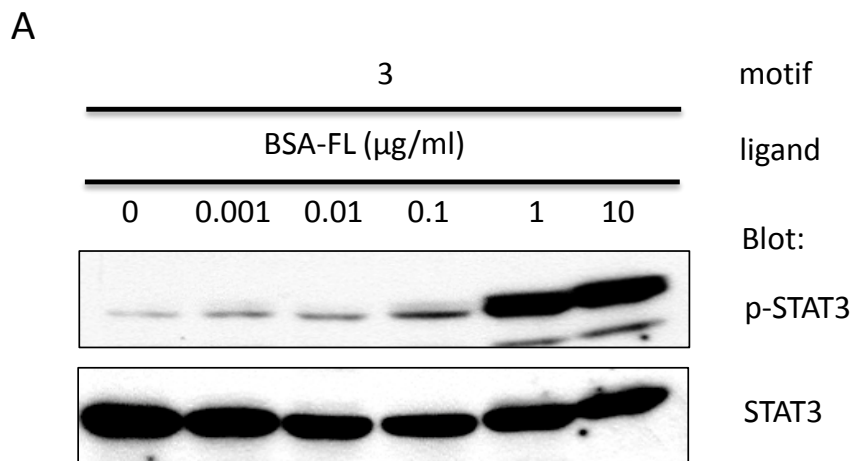


Fig. 5-5 STAT3 活性化のリガンド濃度依存性

A) ウェスタンブロット結果 リガンド刺激時間 : 15 分 B) Image J による定量解析 p-STAT3 量を STAT3 の発現量で規格化し、BSA-FL 0 μg/ml を 1 とした。

つぎに、モチーフを複数受容体に導入することで、受容体の最大活性が刺激時間に応じてどのように変化するか検証した。つまり、STAT3 結合モチーフを複数有する受容体について、BSA-FL 刺激からの時間経過に伴う STAT3 のリン酸化レベルを検証した(Fig. 5-6)。ほぼすべての受容体についてリガンド刺激後 5 分で最大活性に達し、検証したタイムスケールにおいて顕著な刺激応答時間に関する違いは確認されなかった。このことからシグナル伝達蛋白質のリン酸化イベントは、受容体への結合、解離の時間と比較し、速やかに進行すると考えられる。またこの活性化強度の時間依存性は天然の受容体のそれと匹敵している [125-127]。

モチーフ間にリンカーを挿入した 3G3, 3G3G3 について比較すると、3G3 ではモチーフを 1 つ有する受容体と比べ、シグナル強度がリガンド刺激後 15 分で 3.1 倍に上昇すること

が示された。一方 3G3G3 については 3G3 と比較し強度が低かったが、これは 3G3G3 の全長での発現量が低いためであると考えられる。

またモチーフ間にリンカーを挿入しない 33, 333 について同様に検証したところ、同じくモチーフを 1 つ有する受容体と比べシグナル強度は上昇することが示された。またモチーフの個数に応じたシグナル強度の上昇傾向も確認でき、333 ではリガンド刺激から 15 分経過時の活性化強度がモチーフを 1 つ有する受容体と比較し、2.9 倍であった。3G3 の強度と比較すると 33, 333 とともに低い値を示した。これはモチーフ間の距離が短いため受容体に結合し活性化できる STAT3 量が制限されるためであると考えられ、Fig. 4-12 の結果とも一致している。

さらに長期の STAT3 活性化の刺激応答時間の経過を確認するため、3, 33, 333 のリガンド刺激から 2 時間までの STAT3 のリン酸化レベルを検証した(Fig. 5-7)。受容体間で大きな変化は確認されず、天然の受容体において働くフィードバックメカニズムが維持されていることが示唆された。

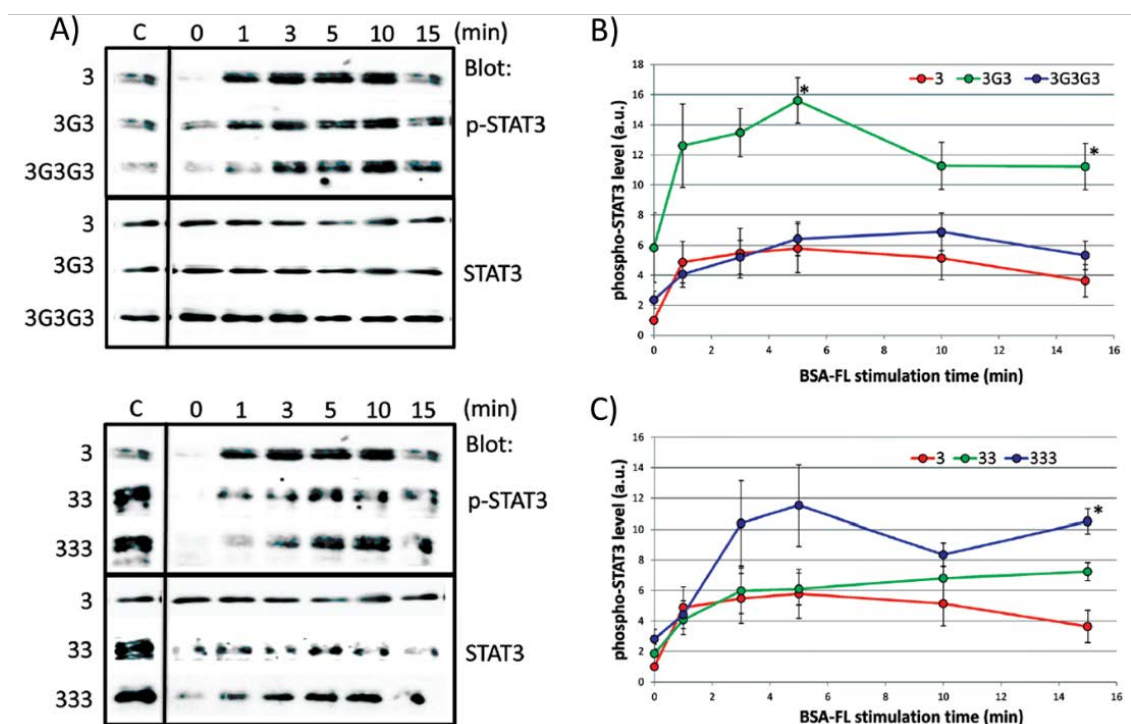


Fig. 5-6 モチーフを複数有する受容体の STAT3 リン酸化量

A) ウェスタンブロッティング結果 BSA-FL: 1 μ g/ml B,C) Image J による定量結果 n=3 or 4 (3G3 の 0 分刺激サンプルのみ n=2)、mean \pm SE で示す。p-STAT3 量を STAT3 の発現量、受容体の表面発現量(Mean)で規格化し、キメラ受容体「3」(BSA-FL: 1 μ g/ml, 0 min)を 1 とした。

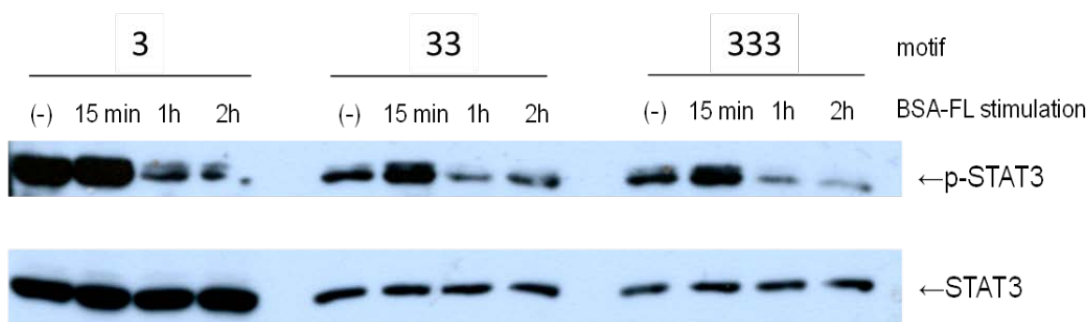


Fig. 5-7 STAT3 活性化強度の時間依存性 BSA-FL : 1 μ g/ml

5.4 考察

本研究によりリガンド濃度や導入モチーフ数を変更することで、キメラ受容体を発現した細胞に対して標的とするシグナル伝達蛋白質の活性化強度を制御できることが示された。

本研究では Ba/F3 細胞を中心にその現象を観察したが、様々な細胞に対してこのキメラ受容体は応用可能であると考えられる。Wierenga らは STAT5 の活性化強度が CD34⁺細胞に与える影響について考察している[128](Fig.5-8)。適切な程度の STAT5 の活性化は細胞の自己複製や長期生存作用を促すが、より高い活性化強度においては赤血球新生を促す。また c-myc は HSC において通常低レベルに発現しているが、一度発現量が亢進すると細胞が活性化され HSC の数が減少する[129]。一方増殖性の造血前駆細胞では c-Myc を高いレベルで発現していることが知られている。

(Fig. 5-8 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig. 5-8 HSC の活性化における STAT5 活性化強度の影響[128] HSC において STAT5 の活性化強度が中程度であるときは高い細胞増殖や自己複製を示すが、高程度であるときは赤血球形成が促進される。

サイトカイン受容体の細胞内ドメインはシグナル伝達蛋白質にとってのスキヤフォールドとして機能している。蛋白質間相互作用の起点となるスキヤフォールド蛋白質は細胞内のシグナル伝達だけでなく神経シナプス、細胞間接着など様々な細胞システムにおいて蛋白質複合体を組織化するために重要な役割を果たす[130-132]。近年、人工的なスキヤフォールド蛋白質が、シグナル伝達を効率的に促す目的で構築されている。Morais らは, cohesin と dockerin の蛋白質モジュール間相互作用を利用したシステムを開発している[133]。また Dueber らは N-WASP が相互作用ドメインによる自己抑制機構を備えていることに着目し、その相互作用ドメインを、ペプチド結合モチーフを有した PDZ ドメインを融合することで、望みのペプチドにより自己抑制制御を解き活性化できるキメラ蛋白質を作製することに成功した[2]。本研究におけるペプチドリンカーを介した機能性ドメイン(チロシンモチーフ)の集積を利用した評価結果は、蛋白質工学的な観点から重要な知見であると考えられる。

また本研究内では **STAT3** の最大活性に着目したが、活性化の持続性を含めたシグナルの蓄積量も細胞運命を制御するにあたって興味深い点である。4章において異なる分子を同時に活性化できることが示されているため、複数のシグナルの活性化強度比を本技術によって変えることも可能であると考えられる。

この技術またはここで得られた知見は、数学的なモデル解析やシステムバイオロジーの概念と組み合わせることで、受容体のシグナル伝達ダイナミクスに関する解析に貢献するだろう [125-127]。

6. ボトムアップ型モチーフエンジニアリングを利用したキメラ受容体による造血幹細胞の運命制御

6.1 研究背景

3~5章まで、ボトムアップ型のモチーフエンジニアリング手法について、蛋白質工学的な観点からそのコンセプトを証明した。本章ではこのエンジニアリング手法を活用したキメラ受容体を利用して、HSCの体外増幅に関わる分子メカニズムの解明を行うことを試みた。

既往のHSCの培養条件には複数のサイトカイン、特にSCFとTPOの組み合わせが使われている。これら2つサイトカインによる刺激はマウスHSCの*in vitro*培養下での自己複製を促すことが知られているため、これらが下流のシグナル伝達蛋白質を活性化するか解明することはHSCを広く臨床応用するために重要である。

造血細胞におけるサイトカインシグナルの解析手法には様々な手段があることが知られている[134]。例えば遺伝子改変受容体を利用したc-Mplの下流シグナルを解析した報告があるが[28, 135]、これらはほとんど造血系の株化細胞を利用している。我々は幹細胞活性におけるサイトカインシグナルの影響をより精緻に解析するため、初代造血幹細胞を使用した移植試験を試みた。過去には、c-Mplをノックアウトした、またはc-Mpl欠損変異体を発現させた遺伝子改変マウスを使用した動物実験による解析結果が報告されている[72, 136-138]。これらのマウスを用いた解析は正常な状態やストレス環境下における状態でc-Mplの役割を明らかにしているが、さらに詳細な解析をするためにはより様々なc-Mpl変異体による遺伝子改変マウスの解析が望まれている[139]。

本研究では、既往の研究で確立された造血幹細胞フェノタイプの解析技術を利用し[140, 141]、ボトムアップ型モチーフエンジニアリングにより構築された受容体をHSC体外増幅に必要なシグナル伝達蛋白質の探索に応用することを試みた。具体的には3章においてSTAT1、STAT3、STAT5、PI3K、Shcに対する結合モチーフを有するキメラ受容体を構築し、各受容体が標的とするシグナル伝達蛋白質を活性化できることを示したため、ここではこれらの受容体をHSCに発現させ標的とする各シグナル伝達蛋白質がHSCの自己複製にどのように寄与するか検証した。検証においては*in vitro*での細胞増殖能だけでなく、分化への寄与や、*in vivo*試験における長期の造血再構成能の評価を実施し、様々な角度からHSCの自己複製能を考察した。

6.2 実験方法

ベクター構築

前章により利用または構築された、pGCDNsam HA-S-Mpl-I/E、pGCDNsam HA-Smpl_{t69}-no_motif-I/Eまたは、pGCDNsam-HA-Smpl_{t69}-(STAT1, STAT3, STAT5, PI3K, Shc)-I/Eを使用した。

モデル動物と細胞株

CD57BL/6 (B6)-Ly5.1、B6-Ly5.2、B6-Ly5.1/Ly5.2 マウスは Japan SLC から購入した。その他は 2 章と同様である。

リポフェクション

レトロウイルストランスダクション

293GPG による濃縮ウイルスの作製

2 章と同様の手法で実施した。

造血幹細胞の取得

CD57/6-Ly5.1 マウスの脛骨、大腿骨、骨盤骨から骨髓細胞を取得した。細胞を抗 c-kit-APC 抗体(BioLegend)、つづいて磁気ビーズ標識抗 APC 抗体でラベルした。MACS により c-kit 陽性細胞を分取した。つづいて分取した細胞を PE 標識抗 Sca-1 抗体、APC 標識抗 c-kit 抗体、FITC 標識抗 CD34 抗体、ビオチン標識抗分化マーカー抗体カクテル、Alexa 780 標識ストレプトアビジンで染色した。CD34-KSL 細胞を MoFlo Cell Sorter (Beckman Coulter) で分取した。

造血幹細胞への遺伝子導入

レトロネクチンコートされた 96 ウェルプレートに播種され一晩以上培養された CD34-KSL 細胞に、MOI 500 とするために必要な量のウイルス上清を、 α -MEM 培地(1 %FBS、1 % PSG)に希釈し、終濃度 50 ng/ml SCF、100 ng/ml TPO とともに添加し感染させた。37°C、5 %CO₂ で 6 時間程度インキュベート後、新たに MOI 600 のウイルス上清を 50 ng/ml SCF、50 ng/ml TPO とともに添加した。

造血幹細胞の増殖アッセイ

遺伝子導入された CD34-KSL 細胞を培養 1 日後、S-clone SF-03 (+50 ng/ml SCF、50 ng/ml TPO)に培地交換して 3 日間培養した。EGFP 陽性細胞を MoFlo で分取した後、25 cells/well で 96 ウェルプレートに播種した。各細胞は S-clone SF-03 (50 ng/ml SCF)、S-clone SF-03 (50 ng/ml SCF、50 ng/ml TPO)、S-clone SF-03 (50 ng/ml SCF、5 μ g/ml BSA-FL)でそれぞれ 6 日間培養された。培養細胞に Flow-count (Beckman Coulter)を添加し FACS CantoII で細胞数を測定した。

造血幹細胞のシングルセルコロニーアッセイ

上記の方法で EGFP 陽性細胞をソーティングした後、1 cell/well で 96 ウェルプレートに播種した。各細胞は、S-clone SF-03 (10% FBS、50 μ M 2-ME)を基本培地とし、10 ng/ml

SCF、10 ng/ml SCF + 5 μ g/ml BSA-FL、10 ng/ml SCF+10 ng/ml TPO+10 ng/ml IL-3+1 unit/ml Epo をそれぞれ添加した条件で 11 日間培養された。顕微鏡観察により 50 細胞以上カウントされたウェルについて、スライドガラスに転写した後、Hemacolor Rapid Staining (Merck)で染色し細胞の形態を観察した。

造血幹細胞 in vivo アッセイ

B6-Ly5.1 マウス 11 匹から CD34-KSL 細胞を採取し、MOI 550 で各遺伝子をレトロウイルスにより導入した。EGFP 陽性細胞をソーティング後、55 cells/well の濃度で播種した。各細胞は S-clone SF-03 (SCF 50 ng/ml, BSA-FL 5 μ g/ml)または S-clone SF-03 (SCF 50 ng/ml, TPO 50 ng/ml)で 5 日間培養した。

培養前 458 個にあたる EGFP 陽性細胞（ドナー細胞）と、B6-Ly5.1/5.2 マウスより採取した骨髓細胞 1.8×10^5 個を混合し、4.9 Gy の強度で 4 時間おき 2 回放射線照射した B6-Ly5.2 マウスの後眼窩に移植した。

移植後 4、8、12、16 週後にマウスの後眼窩から末梢血を採取し、溶血剤として 140 mM NH₄Cl を加えて室温で 5 分間インキュベートした。PBS 1ml を加えて遠心し、上清を除去した。以下の表のとおり混合した抗体を添加し、4°C で 30 分間インキュベートした (Table 6-1)。さらに 140 mM NH₄Cl を添加後、PBS で洗浄し、PI を終濃度 1 μ g/ml で添加した。各細胞表面抗原の発現を FACSCantoII で測定した。

Table 6-1 細胞染色用抗体

抗体	製造元	型番	PBS 1ml に対する抗体量 (μ l)
PE-Cy7-anti-Ly5.1	eBioscience	25-0453-82	3
PacificBlue-anti-Ly5.2	eBioscience	48-0454-82	3
APC-Cy7-anti-B220	eBioscience	47-0452-82	3
APC-anti-GrMac	Biologend	108412	0.5
PE-anti-CD4	Biologend	100512	2
PE-anti-CD8	eBioscience	12-0081-490	2

1 次移植より 16 週間後のマウスから骨髓細胞を取得し、強度 4.9 Gy で 4 時間おきに 2 回放射線照射したレシピエントマウスに移植した。移植後 17 週後に、先述の方法でキメリズム解析を実施した。

6.3 実験結果

先述の結果から、STAT1、STAT3、STAT5、PI3K、Shc の 5 種類の細胞内シグナル伝達蛋白質をそれぞれリクルートできるチロシンモチーフを選定し受容体に融合した結果、各受容体は BSA-FL の刺激により各分子をリン酸化できることが確認されている (Fig. 4-2)。

そこで本研究ではこれら 5 種類の受容体(STAT1, STAT3, STAT5, PI3K, Shc)、モチーフが融合されていない受容体(NM)、c-Mpl の細胞内ドメインを全長で有する受容体(WT)がそれぞれ造血幹細胞の運命制御にどのように寄与するか検証した。

具体的には、造血幹細胞を高純度を含む CD34⁺, c-kit⁺, Sca-1⁺, lineage marker⁻ (CD34-KSL) 細胞をマウスの骨髄から採取し、レトロウイルスを用いて各受容体を遺伝子導入した後、EGFP 陽性である遺伝子導入細胞をフローサイトメーターで単離した[140]。本手法を用いることで SLAM ファミリー蛋白質をマーカーとして使用する純化手法と同等の非常に純度の高いマウス HSC を取得することができる。取得した遺伝子導入細胞はほぼ 100%の EGFP 陽性率であり、したがって受容体の発現率も 100%に近いと考えられる。各遺伝子導入細胞について、増殖アッセイ、細胞染色によるフェノタイプ解析、移植後のキメラ解析による造血再構成能の解析をおこなった(Fig.6-1)。

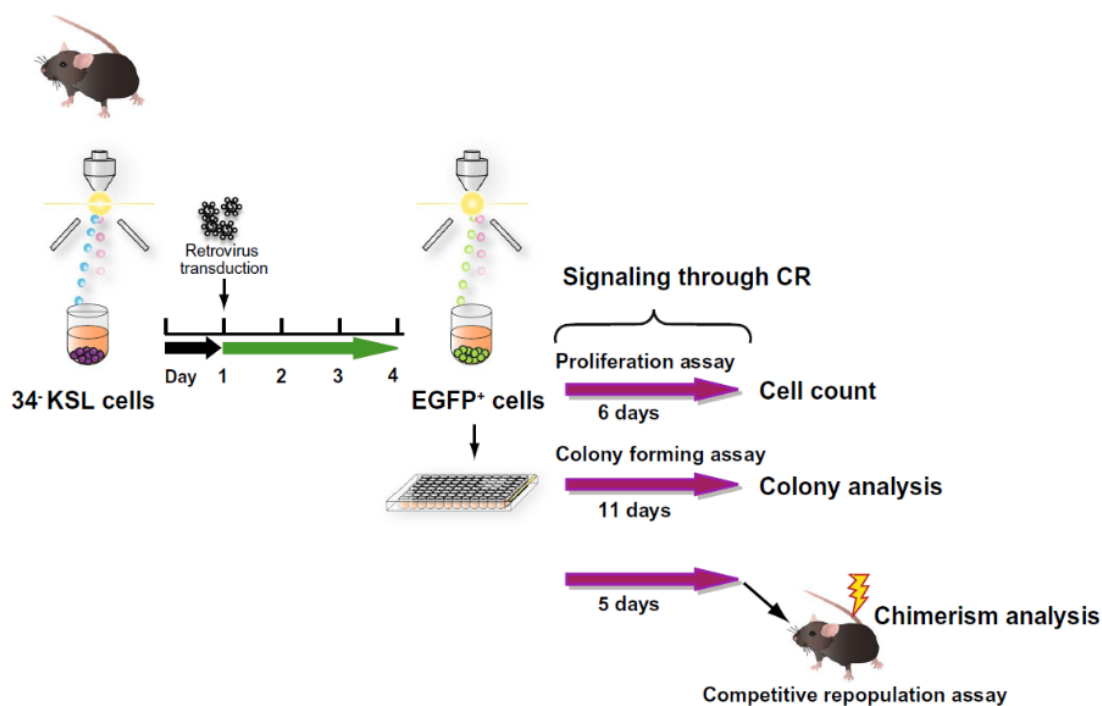


Fig. 6-1 HSC アッセイ概要

まず *in vitro* での増殖アッセイを確立された無血清培養条件を利用しておこなった。リガンド刺激後の細胞数を測定したところ、全ての遺伝子導入細胞について SCF 刺激により増殖が確認されたが、その増殖効果は非常に微弱なものであった。一方で、SCF+TPO の刺激条件では既往の報告と同様に、すべての遺伝子発現細胞で非常に強い細胞増殖効果が示された。空ベクターを導入した細胞(IE)では SCF とともに添加した BSA-FL に依存的な増殖を示さなかった。一方で、導入したすべての受容体発現細胞について SCF 刺激条件と比較し SCF+BSA-FL では強い細胞増殖を確認できた(Fig. 6-2)。このことから no motif による

JAK の活性化のみでも CD34-KSL 細胞の増殖が微弱ながら促進されることが示された。NM と比較したときのさらなる増殖効果はチロシンモチーフにリクルートされたシグナル伝達蛋白質の活性化に伴うものであると考えられるが、SCF+BSA-FL 刺激条件での細胞増殖を各受容体間で比較すると、WT が最も高く、融合した単独モチーフのなかでは STAT5 結合モチーフが強い増殖能を示すことが確認された。従って STAT5 の活性化は HSC の増殖に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

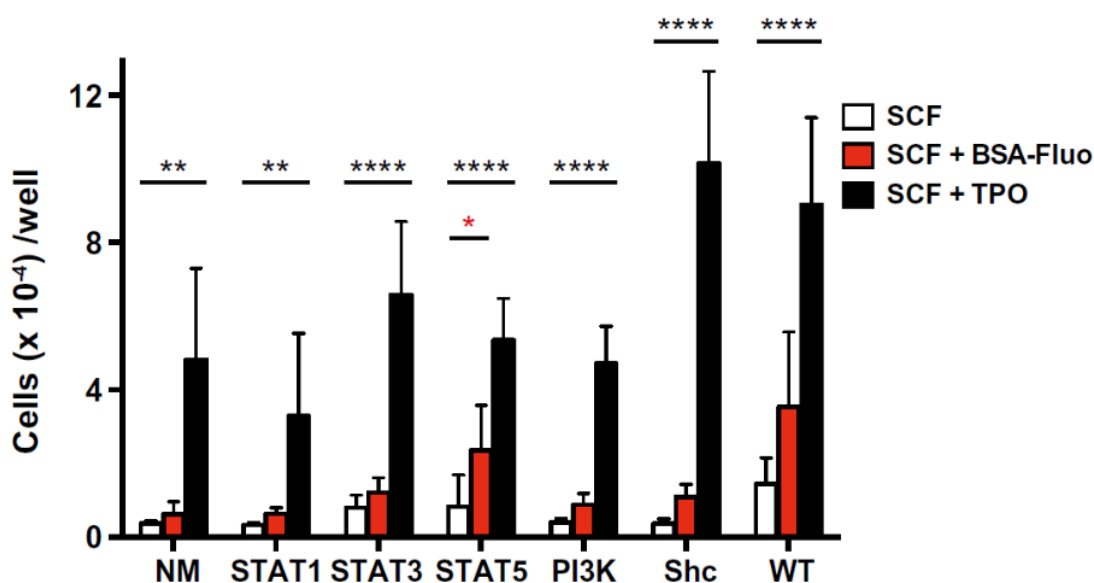


Fig. 6-2 増殖アッセイ

25 cells/well で播種した後リガンド刺激後 6 日後に細胞数を測定した。n=5、mean+SE で示す。一元配置分散分析の後、Holm-Sidak 多重比較検定により p 値を算出した。*P < 0.05、**P < 0.01、****P < 0.0001、SCF : 50 ng/ml、TPO : 50 ng/ml、BSA-FL : 5 µg/ml

次に遺伝子導入細胞をシングルセルで SCF, SCF+BSA-FL, SCF+TPO+IL-3+EPO の各条件でリガンド刺激した後のコロニー形成能を評価し、さらに増殖細胞のフェノタイプを細胞染色により解析した。染色結果をもとに各細胞は好中球(n)、マクロファージ(m)、赤芽球(E)、巨核球(M)に分類される。また、あるウェルに含まれる分化細胞種が多いほど、そのウェルには多分化能を示す幹細胞が含まれており、かつ自己複製していることを示唆する。本結果から、SCF のみによる刺激では WT, STAT3, STAT5, PI3K において細胞が増殖したウェルが確認されたもののその数は非常に少なく、またいずれからも全細胞種への分化を示したウェル(nmEM)は確認されなかった(Fig. 6-3)。また陽性対象として用意したサイトカインカクテルによる培養条件では、20-30 コロニーを 48 個シングルセル解析から得るこ

とができ、また nmEM を示すコロニーも確認できたため、HSC 取得後 4 日経過した遺伝子導入細胞は正しく多分化能を有していることが確認された。一方、SCF+BSA-FL 刺激条件では驚くべきことに I/E と STAT1 を除くすべての受容体発現細胞で細胞増殖を示し、さらに WT と STAT5 では nmEM の存在を確認することができた。従って STAT5 の選択的な活性化は多分化能を有したまま細胞増殖を誘導できる可能性が示唆された。

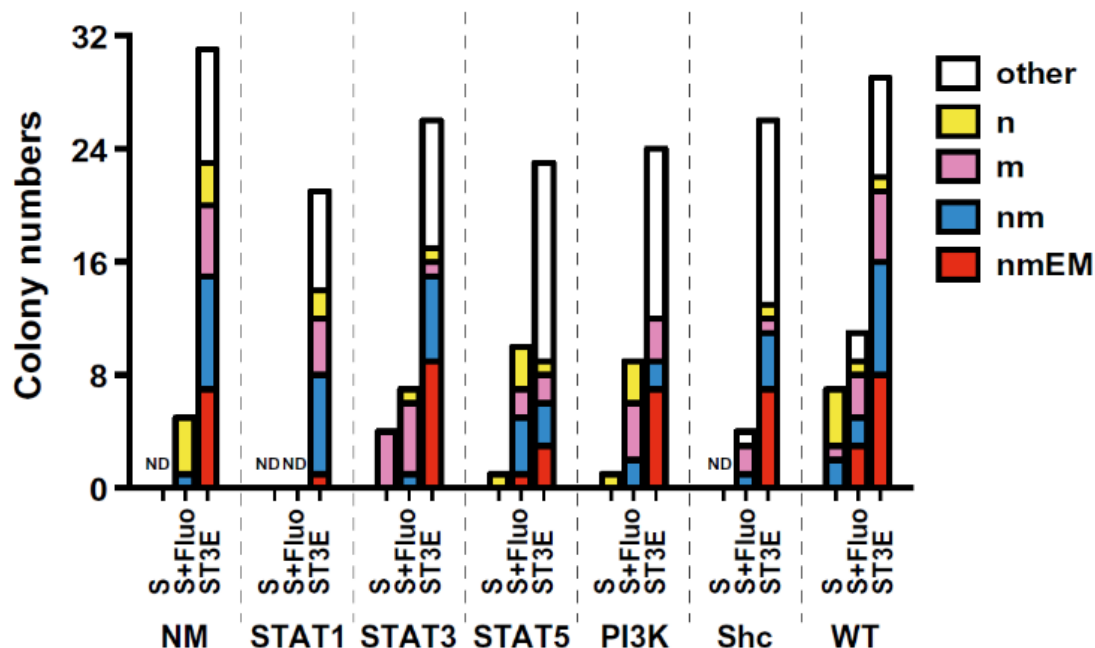


Fig. 6-3 フェノタイプ解析

1 cells/well で播種した後リガンド刺激後 11 日後に評価した。n=48, SCF : 50 ng/ml, BSA-FL : 5 µg/ml, STE3 = SCF+TPO+EPO+IL-3, TPO 50 ng/ml, IL-3 : 50 ng/ml, EPO : 1 unit/ml

以上、増殖アッセイとフェノタイプ解析の結果から、STAT5 結合モチーフの活性化は HSC の強い細胞増殖と多種類の細胞への分化を誘導すると考えられる。つぎに本研究では STAT5 結合モチーフを有する受容体の活性化による、HSC の体外増幅効果についてさらに詳細に解析するため、competitive repopulation アッセイを実施した。造血細胞をモデル動物に移植した後、細胞の生着や造血機能の再構成を確認することで、移植細胞が幹細胞としての性質を有しているか評価することができる。移植前の体外増幅時の HSC 培養条件として 5 群を用意した。ひとつは SCF とともに TPO を添加し内因性の c-Mpl を活性化させた際の効果を確認した。また 3 つは WT、no motif、STAT5 それぞれの受容体を発現した細胞を用いて SCF+BSA-FL の条件で培養をおこなった。最後に陰性対象として受容体遺伝子を含まないベクターを導入した HSC において SCF+BSA-FL の条件で培養した群を用意した。

まず、各群における 1 次移植した後の末梢血中の移植細胞の存在率(キメリズム)を評価す

ると遺伝子未導入の細胞ではほとんどのマウスで 0.1%以下のキメリズム値を示したのに対し、SCF+TPO の培養条件群では平均 10%以上の高いキメリズム値を示した。また、受容体発現細胞(NM, STAT5, WT)間でキメリズム値を比較すると、SCF+BSA-FL 刺激条件ではすべての受容体発現細胞について、1%以上の値を示す個体が存在し、その平均値は WT、STAT5、no motif の順番に高かった(Fig. 6-4 A)。さらに 2 次移植後の解析結果においては、NM ではいずれの個体も遺伝子導入細胞の存在を確認できなかったのに対し、WT、STAT5 ではその存在を確認することができた。従って BSA-FL により刺激を受けた STAT5 結合モチーフを有する受容体発現細胞は、長期にわたり造血再構成能、ひいては造血幹細胞としての性質を維持していることが示唆された。また、各ドナー由来細胞のフェノタイプを解析したところ、WT では、ミエロイド細胞、B 細胞、T 細胞いずれの存在も確認できた。また SCF+TPO 培養条件または WT における SCF+BSA-FL 培養条件では 2 次移植後のフェノタイプ解析結果ではミエロイド細胞の割合が多少高い傾向が観察された。一方で STAT5 では 2 次移植後のみミエロイド細胞の存在が確認できず T 細胞分画の割合は WT と同等であった。(Fig. 6-4 B)。従って STAT5 の活性化は相対的にリンパ系の細胞への分化に寄与することが示唆された。

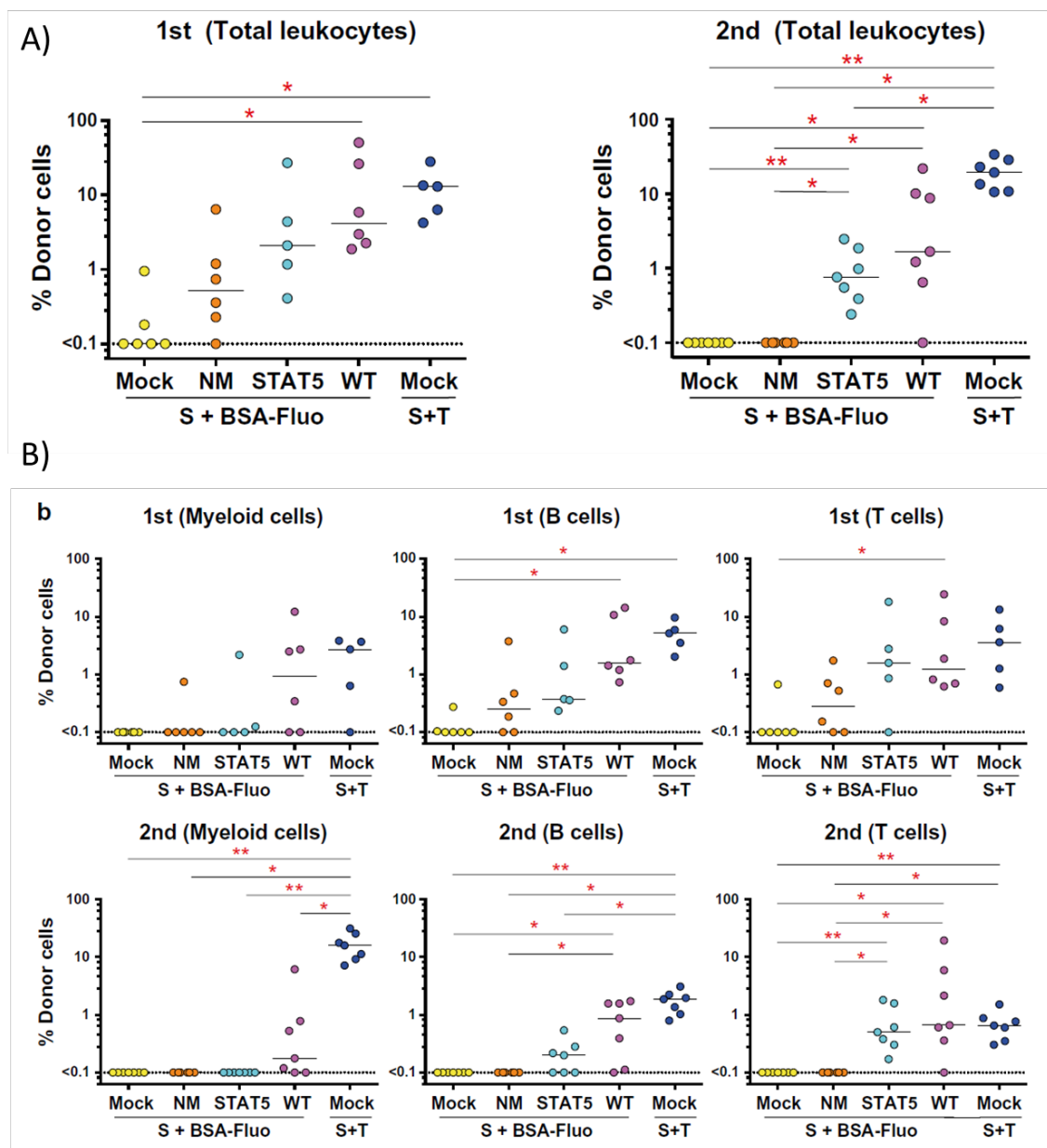


Fig. 6-4 competitive repopulation assay

A) 全末梢血細胞中におけるドナー細胞率 B) ミエロイド細胞、B細胞、T細胞におけるドナー細胞率 B6-Ly5.1+細胞のキメリズム値の定量下限を 0.1%とおいた。Mock は EGFP 遺伝子のみを挿入した条件を示す。Steel-Dwass 法により p 値を算出した。*P < 0.05, **P < 0.01。

6.4 考察

本研究により初めて、初代造血幹細胞を用いて人工的なりガンド・受容体システムにより HSC を支持するシグナルを活性化できることを示した。

利用した実験系について述べると、本研究では高純度化した HSC 分画を使用した。これ

は休止状態を含む HSC を主に含んでいる分画であり、キメラ受容体由来の各シグナルの影響を精緻に解析するうえで、このように細分化されたコンパートメントを利用できることは非常に重要である。competitive repopulation assay の結果から、天然リガンドである SCF と TPO の刺激条件において、再構成された造血細胞のレパトアはミエロイド細胞に対する指向性を示したが、これは成熟した HSC において示された結果と一致しており再現性・安定性の高い試験がこの細胞分画を用いることで実施可能であるといえる[142]。一方で HSC の解析には近年、他の性質の HSC 分画を含む総骨髄細胞の使用が広く普及しており[143, 144]、本研究により利用されたキメラ受容体もこのような細胞分画を利用して解析すれば、また新しい知見が得られる可能性もある。

増殖アッセイとフェノタイプ解析の結果から、STAT5 結合モチーフの活性化は HSC の強い細胞増殖と多種類の細胞への分化を誘導すると考えられる。評価したいずれの受容体もモチーフ非依存的な STAT5 の活性を示すことから、モチーフに由来する STAT5 の活性化が HSC の体外増幅には重要であり、STAT5 活性の強度レベルの重要性が示唆された。実際に STAT5 の活性化強度の変化により遺伝子発現パターンも変化することで自己複製への寄与が変わるという報告がある[128]。また本試験において評価されていないシグナル伝達蛋白質を STAT5 結合モチーフが活性化している可能性もあると考えられるため、この点について追加検証の余地があると考えられる。

また、結果として STAT5 が相対的に最もすぐれた因子であることが示されたが、その他の蛋白質も一定の寄与があると考えられる。実際に in vitro での増殖アッセイの結果から STAT3, PI3K, Shc も統計学的な有意差は低いものの増殖活性を示した。従ってこれら STAT5 以外の重要因子を同定し、それらを同時に活性化させることで期待する効果を得られる可能性がある。

STAT5 結合モチーフを有する受容体は in vivo 試験においても造血幹細胞の自己複製に寄与していることが示された。この受容体は特にリンパ球を維持する能力に長けているが、これは HSC を用いた移植療法においても重要な知見である。例えば重症複合免疫不全に対する遺伝子治療においては、HSC の体外増幅時リンパ球の保持が必要であることが知られている[145-147]。従って本研究により得られた知見は様々な医療分野で役に立つと考えられる。

7. 将来展望と総括

7.1 総括

本研究では、抗体-受容体キメラを利用して、汎用的な細胞内シグナル伝達蛋白質の活性制御系の構築を試みた。トップダウン型のモチーフエンジニアリングを適用した c-Mpl を鋳型とした受容体は、野生型のキメラ受容体と比較し高い造血幹細胞の増殖作用を示した。またボトムアップ型のモチーフエンジニアリングを適用しそのシグナル伝達能を検証したところ、受容体はモチーフ配列依存的に標的シグナル伝達蛋白質を活性化できることが示された。また、複数のチロシンモチーフを1つの受容体に組み込むことで、複数の標的シグナル伝達蛋白質の同時活性化や、シグナル強度を制御することに成功した。さらに構築した抗体-受容体キメラを造血幹細胞の生体外増幅へ応用することを試みた。各種シグナル伝達蛋白質を活性化できるチロシンモチーフの造血幹細胞への寄与を検証したところ、特に STAT5 結合モチーフが造血幹細胞の自己複製能の維持に寄与していることが示された。

本技術により標的とするシグナル伝達蛋白質の機能を解析することができる。また標的とする細胞の機能を改変することで細胞治療、再生医療への応用が可能となる。共通の分子基盤を活用していることで、原理的に多様なシグナル伝達蛋白質を対象とすることが可能であるため、その用途範囲は非常に広いと考えられる。

細胞内に存在するシグナル伝達蛋白質の機能を直接的に制御できる技術という観点では、低分子阻害剤に代表される既存の技術が存在するが、本技術はそれらにはない複数の特徴があると考えられる。①まず細胞外ドメインに任意の scFv を挿入することが可能なため、望みの分子をリガンドとして使用することができる。②また受容体を標的の細胞に発現させた場合、人工リガンドにより標的細胞特異的にシグナルの活性化を誘導できる。③チロシンモチーフを通じたリン酸化は蛋白質を活性化に促す ON 制御として機能することが多く、阻害作用等による機能抑制とは異なる方向性の制御が可能である。④さらに複数のチロシンモチーフを利用することで1分子の受容体から同時に複数種類の蛋白質を活性化することが可能である。

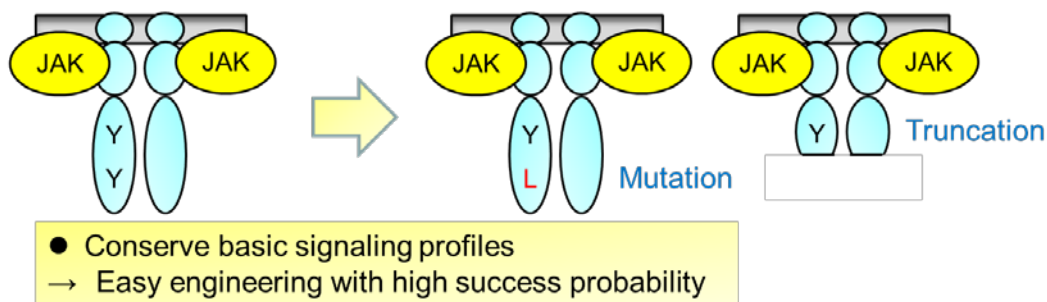
7.2 将来展望

本研究ではトップダウンモチーフエンジニアリングとボトムアップモチーフエンジニアリングの2つの手法を用いて受容体のエンジニアリングを試みた(Fig.7-1)。既往の報告を例に挙げると、Kagoya らは T 細胞活性化シグナルにおいて Signal 3 とよばれるサイトカイン受容体由来のシグナルを活性化できるチロシンモチーフを chimeric antigen receptor (CAR) に導入することで、T 細胞による腫瘍細胞傷害活性を高めることに成功している[148]。Michele らはシグナル伝達蛋白質に対するペプチド性阻害剤のスクリーニングを目的に STAT1, STAT3 それぞれに結合するリン酸化ペプチドを *in vitro* スクリーニングにより同定し、さらにモチーフをサイトカイン受容体に融合することで挿入モチーフ由来のシグナ

ル伝達を誘導できることを示している[87]。これらそれぞれ受容体エンジニアリングアプローチは目的に応じて使い分けが可能である。トップダウン型のエンジニアリングは機能ドメインが明らかである既知の受容体をもとにデザインするため、デザイン上のハードルが低くすばやく望みの結果を得られる可能性が高い。実際に現在の受容体研究においては engineered T 細胞における IL-2 や CD3 を例とするトップダウン型のエンジニアリングアプローチの活用が主流であるといえる。一方、ボトムアップ型のエンジニアリングは正しく機能するまでの検討に時間を要するが、デザイン上の自由度が高く最終的により優れた効果を期待できる手法であると考えられる。今後、トップダウンアプローチの課題点が明確となり、かつプラットフォームの整備と技術の共有が進むことで、トップダウン型のエンジニアリングアプローチの重要性が増すだろう。

また蛋白質の機能解析の側面からは、トップダウン型のエンジニアリングは受容体機能の解明に、ボトムアップ型のエンジニアリングはシグナル伝達蛋白質機能の解明にそれぞれ適しているといえる。

■ Top-down approach: Native receptor like



■ Bottom-up approach: Fully artificial

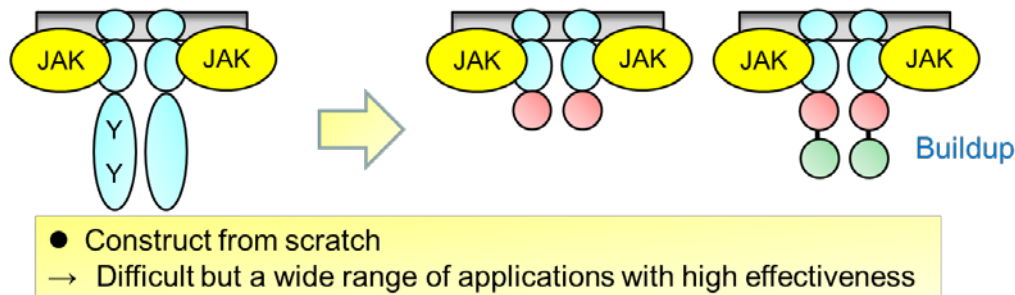


Fig.7-1 モチーフエンジニアリングの特徴

本システムにおいて任意の scFv を選択できることは先述のとおりである。具体的には、体外から人為的にリガンド刺激をおこなうことで活性化のタイミングを精緻に制御することや、標的環境に存在する内因性因子をリガンドとすることで標的疾患組織特異的に活性化させることが可能である。これはすなわち各目的に応じて適切な scFv を選択する必要があるともいえる。前者の場合は、毒性や抗原性が低いこと、物理的安定性が高いことが必要

条件として挙げられる。また体内に投与する際、一定期間にわたりシグナルが持続する必要がある、高分子性、特に Fc 融合タンパクなどの薬物動態の良い分子であることが望ましい。逆に素早い消失を望む場合は低分子が好ましいと考えられる。後者のように内因性分子をリガンドとする場合は、標的環境特異的に存在する分子を抗原とする scFv が望ましいケースが多い。標的とする分子が多価抗原でない場合は、標的分子の異なるエピトープを狙う 2 種の scFv により受容体の 2 量化を誘導するか、リガンド結合に応答した受容体の構造変化等をメカニズムとしてシグナル伝達を誘起できる受容体をベースにキメラ受容体をエンジニアリングする必要がある。

本試験において構築された受容体の一部ではリガンド非存在下におけるシグナルの活性化が確認された。これは過剰発現した受容体の細胞膜上密度が高いことで、近接による受容体活性化イベントを起こしやすい環境であることが一因であると考えられる。サイトカイン受容体の活性化には、その非活性型から活性型へ高次構造の変化を通じて遷移することが示唆されており、リガンド依存性の改善には構築したキメラ受容体のさらなる高次構造への理解も重要であるといえる。Sokolosky らは IL-2 とその受容体の双方を蛋白質工学的な手法でエンジニアリングすることで、天然の分子と交差せず IL-2 シグナルを活性化できる分子ペアを作製することに成功している[149]。IL-2 と IL-2 受容体全体の構造を模倣しているため、リガンドの応答性やその IL-2 シグナルの質は天然のそれと同等の性能を有していると考えられる。人工受容体として利用する細胞内ドメインが天然の構造と類似するケースではこのようなアプローチも選択肢となるだろう。

リガンドと受容体の結合様式が変わるとリガンド応答性だけでなく、シグナルの強度や活性化パターンにも影響を与えることが知られている。既往の報告ではフルオレセインダイマーにおけるダイマー間距離をオリゴヌクレオチド長で変更することで、抗フルオレセイン抗体受容体キメラの活性が増減することが示されている[150]。また Mohan らは構造が異なる人工アゴニストを EpoR に作用させることで活性化されるシグナルの種類に対する指向性が変わることを明らかにした[151]。このことからリガンドや細胞外ドメインの組み合わせをあらかじめ定めた上で、適切なモチーフを探索することが望ましいと考えられる。

細胞内ドメインエンジニアリングの観点からの本研究の今後の展望としては、①望みの性質を有するモチーフをスクリーニングする技術の開発や、②モチーフ非依存的な STAT5 活性化の抑制が挙げられる。

モチーフをスクリーニングするための要件として、まずリン酸化修飾されたペプチドをスクリーニングしなければならない。また細胞内蛋白に対する結合を評価するため標的蛋白質の調製が容易であることや、リン酸化依存的な結合活性だけでなくシグナル伝達能を評価できること(モチーフが JAK の基質として機能する、結合したシグナル伝達蛋白質がリン酸化修飾をうける、カスケード下流へシグナルを伝達するなど)が望ましい。現在では人工的に合成されたリン酸化チロシンペプチドライブラリーを利用して目的のチロシンモチ

ーフをスクリーニングすることが可能である(Fig.7-2)。Michele らはビーズ上にリン酸化ペプチドライブラリーを合成し、フローサイトメーターで結合ペプチドをソーティングする手法を用いて、望みのモチーフ配列の同定に成功している[87]。また Uyttendaele らは GHR に含まれる複数のチロシンモチーフから STAT5 を活性化できるモチーフを同定するため、各モチーフを細胞内ドメインに融合したキメラ受容体と、STAT5 が細胞内で受容体に結合するとレポーター遺伝子が活性化するシステムを利用して、モチーフの機能を評価するシステムを構築している(Fig.7-3)。スクリーニング対象の配列には遺伝子ライブラリーを用いることで多検体評価も可能であると考えられる。特にこの手法はパニングが可能であること(選抜された細胞の増幅が容易であり、繰り返し評価による結合配列の濃縮が可能であること)、標的シグナル伝達蛋白質の精製・発現が不要なことから本目的に適していると考えられる。

(Fig. 7-2 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig. 7-2 人工チロシンモチーフライブラリーの利用事例[152] ビーズに固相したリン酸化チロシンペプチドライブラリーを標的分子と結合させ、結合を示すビーズに固相されたペプチドの配列を MS により同定する。

(Fig. 7-3 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig. 7-3 MAPPIT システム概要[91] Bait としてチロシンモチーフをキメラ受容体に融合し、Prey として標的結合分子と STAT 結合モチーフの融合蛋白を細胞内に発現させる。Bait がキメラ受容体の活性化に起因してリン酸化され、かつ Prey と結合したとき、STAT が活性化されレポーター遺伝子が活性化する。

本試験では c-Mpl をベースとしたエンジニアリングを試みた。c-Mpl の細胞内ドメイン一次構造上、他のサイトカイン受容体と比較し短く、その機能がアミノ酸残基レベルで解明されているため、エンジニアリングに適していると考えた。チロシン残基のリン酸化に限らず、セリン/スレオニン残基のリン酸化をはじめ、アセチル化、酸化還元、脂質修飾、ユビキチン化、SUMO 化など様々な修飾が受容体やシグナル伝達蛋白質の活性化メカニズムに寄与することが知られている。さらなる展望として、これらの翻訳後修飾もチロシンキナーゼ活性を有する c-Mpl とは異なる酵素活性を有する受容体をベースにエンジニアリングすることで制御できれば、機能の多様性は格段に広がるだろう。

また本研究結果から JAK2 によりモチーフ非依存的に STAT5 を活性化することが明らかとなった。選択的に望みの分子を活性化するためにこの現象は抑制できることが望ましい。本研究で利用した受容体(c-Mpl)は JAK ファミリーの中で JAK2 を優位に活性化する一方、別の JAK ファミリー蛋白質のひとつである JAK1 は JAK2 と異なり STAT5 を直接的に活性化しないことが知られている。従って受容体と JAK の結合界面をエンジニアリングする

ことで、受容体が結合するキナーゼの選択性を JAK2 以外にすることが一案であると考えられる。またキナーゼドメインを内包した受容体（受容体型チロシンキナーゼ）を鋳型にエンジニアリングし、内在するチロシンモチーフを除去することも原理的に可能である。

本研究の結果から、構築されたキメラ受容体により HSC の体外増幅効果の向上やそれに必要な因子を同定できることが示された。キメラ受容体を医療に直接的に応用する場合、必然的に細胞治療として考える必要がある。造血幹細胞移植は、細胞をソースとする数少ない確立された治療法でありその課題が臨床レベルで明らかである。また幹細胞を扱う際には多様な細胞への分化を制御する必要があるため課題解決へのハードルが高い。従って HSC の体外増幅はキメラ受容体の医療への応用先として特に検討する価値があると考えられる。

HSC の体外増幅への応用における今後の展望として、ボトムアップエンジニアリングにより既存のサイトカインカクテル刺激では達成できない増幅効果を示すことが挙げられる。実際に、本研究成果からトップダウンエンジニアリングにより構築された c-Mpl 変異体のひとつは、野生型配列を有するキメラ受容体と比較し有意な増幅効果の上昇が確認されたが、天然に発現する TPO/c-Mpl シグナルを超える効果は得られなかった。従ってさらなる改良が必要であるが、それはボトムアップアプローチにより達成できる可能性がある。具体的には、本研究から STAT5 が重要因子として同定されたため、さらにその他の重要因子を同定し、それらを同時に活性化させることで期待する効果を得られる可能性がある。

本研究では STAT1, STAT3, STAT5, PI3K, Shc の 5 種類の蛋白質を標的にそれらの活性化による HSC への寄与を評価した。結果として STAT5 が相対的に最もすぐれた因子であることが示されたが、その他の蛋白質も一定の寄与があると考えられる。実際に *in vitro* での増殖アッセイの結果から STAT3, PI3K, Shc も統計学的な有意差は低いものの増殖活性を示した。また本成果をもとに STAT3, STAT5, Shc のモチーフを組み合わせた受容体を構築し HSC の増殖アッセイを行った結果から、それらのモチーフをすべて含む受容体はもっとも増殖効果が高く、c-Mpl 野生型の細胞内ドメインを有する受容体と比較し、5 倍以上の増殖効果が示されている[153]。また、これら 5 種類以外にも既往の報告から HSC の体外増幅に重要な因子が多数同定されており、上記と同様に標的シグナル伝達蛋白質として挙げられる。Geqiang らは Gab2 の活性化が STAT5 活性化と相乗的に HSC の自己複製に寄与することを証明している[154]。既往の研究では、天然とは異なるサイトカイン受容体のヘテロ 2 量化を人工アゴニストで誘導することで、天然には起こりえないシグナルの活性化を促した例もあり、複雑なシグナルネットワークを人為的に制御する技術については関心が高いといえる。

本手法は造血幹細胞移植にとどまらず様々な応用可能性を秘めていると考えられる。例えばがん領域においては、CAR-T 細胞療法によるがん治療への劇的な効果が示されており、CAR のエンジニアリングに本手法を活用できる可能性がある。CAR は T 細胞活性化シグナルを促進する役割を果たすが、T 細胞活性化シグナルは Signal 1(TCR シグナル), Signal 2(共刺激シグナル), Signal 3(サイトカインシグナル)から成る。そして Signal 1 を中心に活

活性化する第 1 世代 CAR をはじめとして、共刺激シグナルに寄与する膜蛋白の細胞内ドメインを CAR に組み込むことで Signal 2 を同時に活性化できる CAR も開発されている。Kagoya らは CAR に Signal 3、特に STAT3/STAT5 を活性化できるチロシンモチーフを導入することで CAR-T 細胞のがん細胞傷害活性が高くなることを示した[148] (Fig.7-4)。このことから、本研究手法による体系的なモチーフエンジニアリングの推進により、既存のデザインから有効性の面でさらに超えた CAR を構築できる可能性があると考えられる。

(Fig. 7-4 は公開について著作権者からの許諾が得られていないため除外している)

Fig.7-4 CAR に対するモチーフエンジニアリング実施例 A) CD3z ドメインの LHMQ 配列を YRHQ に置換することで STAT3 活性化能を増強 (28-dIL2RB-z(YXXQ))。B) 構築受容体の STAT3, STAT5 リン酸化量[148]

血球細胞は複雑な組織構造を有しておらず、その移植の容易さから細胞治療のソースとして活用が進んでいるが、今後の再生医療関連技術の発展により対象となる細胞種は格段に増えるだろう[155]。間葉系幹細胞や iPS 細胞はその多分化能による汎用性と、精密な分化制御に対するニーズから、その課題解決にキメラ受容体は大いに貢献すると考えられる。例を挙げると、De Luca らは表皮水疱症の治療を目的に自家組織特異性幹細胞から皮膚を再生することに成功している[156]。また最新の知見では心不全患者への治療を目的に fibrin patch に埋め込まれた ESC 由来の幹細胞を移植することで心収縮力の増加をフェーズ 1 試験において確認することができている[157]。眼領域においては加齢性黄斑変性を対象に網膜色素上皮細胞移植のフェーズ 1 試験が進行している[158]。今後は神経細胞の移植試験も実用化に向け増えていくだろう。

既往の研究から *in vitro* 組織分化誘導では細胞は未成熟であることが多く、移植後における *in vivo* での細胞の成熟過程が必要であることが知られている。キメラ受容体を介した人工リガンドによる *in vivo* 分化誘導技術はこのニーズに強く応えるものである。また、キメラ受容体の利用には受容体遺伝子の導入が必要であるが、移植細胞ソースを十分量確保し必要時に迅速に供給するため他家 iPS 細胞の活用が望まれており、iPS 細胞作製の機会を活用することで負荷なく受容体遺伝子を導入することができると考えている。

8. 参考文献

1. Pryciak, P.M., *Designing new cellular signaling pathways*. Chem Biol, 2009. **16**(3): p. 249-54.
2. Dueber, J.E., et al., *Reprogramming control of an allosteric signaling switch through modular recombination*. Science, 2003. **301**(5641): p. 1904-8.
3. Dueber, J.E., E.A. Mirsky, and W.A. Lim, *Engineering synthetic signaling proteins with ultrasensitive input/output control*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(6): p. 660-2.
4. Yeh, B.J., et al., *Rewiring cellular morphology pathways with synthetic guanine nucleotide exchange factors*. Nature, 2007. **447**(7144): p. 596-600.
5. Gorby, C., et al., *Mapping Determinants of Cytokine Signaling via Protein Engineering*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2143.
6. Constantinescu, S.N., et al., *Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4379-84.
7. Matthews, E.E., et al., *Thrombopoietin receptor activation: transmembrane helix dimerization, rotation, and allosteric modulation*. FASEB J, 2011. **25**(7): p. 2234-44.
8. Brooks, A.J., et al., *Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor*. Science, 2014. **344**(6185): p. 1249783.
9. Watowich, S.S., D.J. Hilton, and H.F. Lodish, *Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(6): p. 3535-49.
10. Kubatzky, K.F., et al., *Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor*. Curr Biol, 2001. **11**(2): p. 110-5.
11. Zang, H., et al., *The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis*. EMBO J, 2001. **20**(12): p. 3156-66.
12. Kelly-Spratt, K.S., et al., *A TrkB/insulin receptor-related receptor chimeric receptor induces PC12 cell differentiation and exhibits prolonged activation of mitogen-activated protein kinase*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(12): p. 805-12.
13. Ohashi, H., et al., *Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 158-62.
14. Kawahara, M., et al., *Mimicry of erythropoietin and interleukin-6 signalling by an antibody/cytokine receptor chimera in murine myeloid 32D cells*. J Biochem, 2007. **141**(4): p. 563-71.
15. Kaneko, E., et al., *Growth control of genetically modified cells using an antibody/c-*

- Kit chimera*. J Biosci Bioeng, 2012. **113**(5): p. 641-6.
16. Kawahara, M., et al., *Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera*. Cytokine, 2011. **55**(3): p. 402-8.
 17. Sogo, T., et al., *Selective expansion of genetically modified T cells using an antibody/interleukin-2 receptor chimera*. J Immunol Methods, 2008. **337**(1): p. 16-23.
 18. Nakabayashi, H., et al., *Construction of antibody/insulin receptor chimera for growth induction of mammalian cells*. Cytotechnology, 2013. **65**(6): p. 945-53.
 19. Kawahara, M., H. Ueda, and T. Nagamune, *Engineering cytokine receptors to control cellular functions*. Biochemical Engineering Journal, 2010. **48**.
 20. Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar, *Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 10024-8.
 21. Kochenderfer, J.N., et al., *Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells*. Blood, 2010. **116**(19): p. 3875-86.
 22. Zhukovsky, E.A., R.J. Morse, and M.V. Maus, *Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection*. Curr Opin Immunol, 2016. **40**: p. 24-35.
 23. Bulut, G.B., et al., *Ubiquitination regulates the internalization, endolysosomal sorting, and signaling of the erythropoietin receptor*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6449-57.
 24. Bonifacino, J.S. and L.M. Traub, *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 395-447.
 25. Songyang, Z., et al., *SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*. Cell, 1993. **72**(5): p. 767-78.
 26. Stahl, N., et al., *Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors*. Science, 1995. **267**(5202): p. 1349-53.
 27. Auzenne, E.J., et al., *A phosphopeptide mimetic prodrug targeting the SH2 domain of Stat3 inhibits tumor growth and angiogenesis*. J Exp Ther Oncol, 2012. **10**(2): p. 155-62.
 28. Gurney, A.L., et al., *Distinct regions of c-Mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5292-6.
 29. Bouscary, D., et al., *Role of Gab proteins in phosphatidylinositol 3-kinase activation*

- by *thrombopoietin (Tpo)*. *Oncogene*, 2001. **20**(18): p. 2197-204.
30. May, P., et al., *Comparative study on the phosphotyrosine motifs of different cytokine receptors involved in STAT5 activation*. *FEBS Lett*, 1996. **394**(2): p. 221-6.
 31. Smith, M.J., et al., *Screening for PTB domain binding partners and ligand specificity using proteome-derived NPXY peptide arrays*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(22): p. 8461-74.
 32. Bauer, B. and A. Steinle, *HemITAM: A single tyrosine motif that packs a punch*. *Sci Signal*, 2017. **10**(508).
 33. Muller, K., et al., *Rapid identification of phosphopeptide ligands for SH2 domains. Screening of peptide libraries by fluorescence-activated bead sorting*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(28): p. 16500-5.
 34. Dente, L., et al., *Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides*. *J Mol Biol*, 1997. **269**(5): p. 694-703.
 35. Huang, H., et al., *Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain*. *Mol Cell Proteomics*, 2008. **7**(4): p. 768-84.
 36. Sheinerman, F.B., B. Al-Lazikani, and B. Honig, *Sequence, structure and energetic determinants of phosphopeptide selectivity of SH2 domains*. *J Mol Biol*, 2003. **334**(4): p. 823-41.
 37. Abe, Y., et al., *Deep Phosphotyrosine Proteomics by Optimization of Phosphotyrosine Enrichment and MS/MS Parameters*. *J Proteome Res*, 2017. **16**(2): p. 1077-1086.
 38. Christofk, H.R., et al., *Proteomic screening method for phosphopeptide motif binding proteins using peptide libraries*. *J Proteome Res*, 2011. **10**(9): p. 4158-64.
 39. Greenlund, A.C., et al., *Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91)*. *EMBO J*, 1994. **13**(7): p. 1591-600.
 40. Floss, D.M., et al., *Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(27): p. 19386-400.
 41. Klingmuller, U., et al., *Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8324-8.
 42. Hou, J., et al., *An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat*. *Science*, 1994. **265**(5179): p. 1701-6.
 43. Songyang, Z., et al., *Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2,*

- fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2777-85.
44. Rozakis-Adcock, M., et al., *The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1*. Nature, 1993. **363**(6424): p. 83-5.
45. Lupher, M.L., Jr., et al., *The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 33140-4.
46. Tamagnone, L., et al., *Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates*. Cell, 1999. **99**(1): p. 71-80.
47. Sweeney, M.C., et al., *Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains*. Biochemistry, 2005. **44**(45): p. 14932-47.
48. De Souza, D., et al., *SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities*. Biochemistry, 2002. **41**(29): p. 9229-36.
49. Poy, F., et al., *Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 555-61.
50. Bunnell, S.C., et al., *Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade*. J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 2219-30.
51. Jones, N., et al., *Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes*. Nature, 2006. **440**(7085): p. 818-23.
52. Chemnitz, J.M., et al., *SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 945-54.
53. Blaese, R.M., et al., *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years*. Science, 1995. **270**(5235): p. 475-80.
54. Kay, M.A., et al., *Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector*. Nat Genet, 2000. **24**(3): p. 257-61.
55. Ginn, S.L., et al., *Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update*. J Gene Med, 2018. **20**(5): p. e3015.
56. Oh, I.H. and R.K. Humphries, *Concise review: Multidimensional regulation of the hematopoietic stem cell state*. Stem Cells, 2012. **30**(1): p. 82-8.
57. Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus*

- differentiation*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(6): p. 640-53.
58. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
 59. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
 60. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman, *Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells*. Science, 1988. **241**(4861): p. 58-62.
 61. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. **273**(5272): p. 242-5.
 62. Schmid, M.A., et al., *Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment*. Immunol Rev, 2010. **234**(1): p. 32-44.
 63. Huang, E., et al., *The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor; the gene product of the W locus*. Cell, 1990. **63**(1): p. 225-33.
 64. Geissler, E.N., E.C. McFarland, and E.S. Russell, *Analysis of pleiotropism at the dominant white-spotting (W) locus of the house mouse: a description of ten new W alleles*. Genetics, 1981. **97**(2): p. 337-61.
 65. Ogawa, M., et al., *Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells*. J Exp Med, 1991. **174**(1): p. 63-71.
 66. Carow, C.E., et al., *Mast cell growth factor (c-kit ligand) supports the growth of human multipotential progenitor cells with a high replating potential*. Blood, 1991. **78**(9): p. 2216-21.
 67. Li, C.L. and G.R. Johnson, *Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells*. Blood, 1994. **84**(2): p. 408-14.
 68. Muench, M.O., J.G. Schneider, and M.A. Moore, *Interactions among colony-stimulating factors, IL-1 beta, IL-6, and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells*. Exp Hematol, 1992. **20**(3): p. 339-49.
 69. Metcalf, D. and N.A. Nicola, *Direct proliferative actions of stem cell factor on murine bone marrow cells in vitro: effects of combination with colony-stimulating factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(14): p. 6239-43.
 70. Sitnicka, E., et al., *The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells*. Blood, 1996. **87**(12): p. 4998-

- 5005.
71. Ema, H., et al., *In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1281-8.
 72. Kimura, S., et al., *Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1195-200.
 73. Wang, Z. and H. Ema, *Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells*. Int J Hematol, 2016. **103**(5): p. 498-509.
 74. Omatsu, Y., et al., *Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 536-40.
 75. Guo, X. and X.F. Wang, *Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways*. Cell Res, 2009. **19**(1): p. 71-88.
 76. Cavazzana, M., et al., *Stem cell transplantation for primary immunodeficiencies: the European experience*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2014. **14**(6): p. 516-20.
 77. Thomas, E.D., et al., *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*. N Engl J Med, 1957. **257**(11): p. 491-6.
 78. 大津真, 原発性免疫不全症 : 造血幹細胞を標的とする SCID、WAS、CGD の遺伝子治療. 医学のあゆみ. **265**(5).
 79. Thrasher, A.J. and D.A. Williams, *Evolving Gene Therapy in Primary Immunodeficiency*. Mol Ther, 2017. **25**(5): p. 1132-1141.
 80. Hershfield, M.S., *Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecular basis, and therapy*. Semin Hematol, 1998. **35**(4): p. 291-8.
 81. Aiuti, A., et al., *Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2410-3.
 82. de Lima, M., et al., *Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture*. N Engl J Med, 2012. **367**(24): p. 2305-15.
 83. Horwitz, M.E., et al., *Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment*. J Clin Invest, 2014. **124**(7): p. 3121-8.
 84. Wagner, J.E., Jr., et al., *Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft*. Cell Stem Cell, 2016. **18**(1): p. 144-55.
 85. Cutler, C., et al., *Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2013. **122**(17): p. 3074-81.
 86. Xie, J. and C. Zhang, *Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells*. Sci China Life Sci, 2015. **58**(9): p. 839-53.
 87. Wiederkehr-Adam, M., et al., *Characterization of phosphopeptide motifs specific for the Src homology 2 domains of signal transducer and activator of transcription 1*

- (*STAT1*) and *STAT3*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(18): p. 16117-28.
88. Kisseleva, T., et al., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. *Gene*, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
 89. Funaki, M., et al., *Structure and function of phosphatidylinositol-3,4 kinase*. *Cell Signal*, 2000. **12**(3): p. 135-42.
 90. Aksamitiene, E., A. Kiyatkin, and B.N. Kholodenko, *Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance*. *Biochem Soc Trans*, 2012. **40**(1): p. 139-46.
 91. Uyttendaele, I., et al., *Mammalian protein-protein interaction trap (MAPPIT) analysis of STAT5, CIS, and SOCS2 interactions with the growth hormone receptor*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(11): p. 2821-31.
 92. Damen, J.E., et al., *Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpoR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpoR-associated PI 3-kinase activity*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(40): p. 23402-8.
 93. Kaushansky, K., *Molecular mechanisms of thrombopoietin signaling*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7 Suppl 1**: p. 235-8.
 94. Varghese, L.N., et al., *The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017. **8**: p. 59.
 95. Fujitani, Y., et al., *An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT*. *Oncogene*, 1997. **14**(7): p. 751-61.
 96. He, F., et al., *A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(5): p. 616-25.
 97. Toyota, T., et al., *Population study of sizes and components of self-reproducing giant multilamellar vesicles*. *Langmuir*, 2008. **24**(7): p. 3037-44.
 98. Toyota, T., et al., *Fluorescence microscopic investigation on morphological changes of giant multilamellar vesicles induced by amphiphilic additives*. *Langmuir*, 2006. **22**(5): p. 1976-81.
 99. Tobias, A.V. and F.H. Arnold, *Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: a model for diversification of natural product pathways*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(2): p. 235-46.
 100. Umeno, D. and F.H. Arnold, *Evolution of a pathway to novel long-chain carotenoids*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(5): p. 1531-6.
 101. Pisarev, A.V., C.U. Hellen, and T.V. Pestova, *Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes*. *Cell*, 2007. **131**(2): p. 286-99.
 102. Hartley, R.S., R.E. Rempel, and J.L. Maller, *In vivo regulation of the early*

- embryonic cell cycle in Xenopus*. Dev Biol, 1996. **173**(2): p. 408-19.
103. Lopez-Aviles, S., et al., *Irreversibility of mitotic exit is the consequence of systems-level feedback*. Nature, 2009. **459**(7246): p. 592-5.
104. Murray, A.W. and M.W. Kirschner, *Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle*. Nature, 1989. **339**(6222): p. 275-80.
105. Dahlen, D.D., V.C. Broudy, and J.G. Drachman, *Internalization of the thrombopoietin receptor is regulated by 2 cytoplasmic motifs*. Blood, 2003. **102**(1): p. 102-8.
106. Linnekin, D., C.S. DeBerry, and S. Mou, *Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 27450-5.
107. Timokhina, I., et al., *Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation*. EMBO J, 1998. **17**(21): p. 6250-62.
108. Kozlowski, M., et al., *SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 2089-99.
109. Price, D.J., et al., *Direct association of Csk homologous kinase (CHK) with the diphosphorylated site Tyr568/570 of the activated c-KIT in megakaryocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(9): p. 5915-20.
110. Yu, M., et al., *The scaffolding adapter Gab2, via Shp-2, regulates kit-evoked mast cell proliferation by activating the Rac/JNK pathway*. J Biol Chem, 2006. **281**(39): p. 28615-26.
111. Gouwy, M., et al., *Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(6): p. 561-80.
112. Chen, X., J.L. Zaro, and W.C. Shen, *Fusion protein linkers: property, design and functionality*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(10): p. 1357-69.
113. Yu, K., et al., *Synthetic fusion protein design and applications*. Biotechnol Adv, 2015. **33**(1): p. 155-164.
114. Bachmann, M. and T. Moroy, *The serine/threonine kinase Pim-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 726-30.
115. Liu, W., et al., *Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency*. Biotechnol Bioeng, 2008. **101**(5): p. 975-84.
116. Olcese, L., et al., *Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4531-4.
117. Ono, M., et al., *Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for*

- inhibitory signaling*. Cell, 1997. **90**(2): p. 293-301.
118. Vely, F., et al., *Differential association of phosphatases with hematopoietic co-receptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 1994-2000.
119. Dahlberg, A., C. Delaney, and I.D. Bernstein, *Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6083-90.
120. Zhu, J. and W.E. Paul, *Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 247-62.
121. Perry, J.M., et al., *Cooperation between both Wnt/ β -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion*. Genes Dev, 2011. **25**(18): p. 1928-42.
122. Braun, D.A., M. Fribourg, and S.C. Sealfon, *Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation*. J Biol Chem, 2013. **288**(5): p. 2986-93.
123. Ingolia, N.T. and A.W. Murray, *Positive-feedback loops as a flexible biological module*. Curr Biol, 2007. **17**(8): p. 668-77.
124. Bashor, C.J., et al., *Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics*. Science, 2008. **319**(5869): p. 1539-43.
125. Won, H.H., et al., *Comparative analysis of the JAK/STAT signaling through erythropoietin receptor and thrombopoietin receptor using a systems approach*. BMC Bioinformatics, 2009. **10 Suppl 1**: p. S53.
126. Rybinski, M. and A. Gambin, *Model-based selection of the robust JAK-STAT activation mechanism*. J Theor Biol, 2012. **309**: p. 34-46.
127. Schelker, M., et al., *Comprehensive estimation of input signals and dynamics in biochemical reaction networks*. Bioinformatics, 2012. **28**(18): p. i529-i534.
128. Wierenga, A.T., E. Vellenga, and J.J. Schuringa, *Maximal STAT5-induced proliferation and self-renewal at intermediate STAT5 activity levels*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(21): p. 6668-80.
129. Murphy, M.J., A. Wilson, and A. Trumpp, *More than just proliferation: Myc function in stem cells*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(3): p. 128-37.
130. Huber, A., *Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction*. Eur J Neurosci, 2001. **14**(5): p. 769-76.
131. Kim, S.K., *Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(6): p. 853-9.
132. Tsunoda, S. and C.S. Zuker, *The organization of INAD-signaling complexes by a multivalent PDZ domain protein in Drosophila photoreceptor cells ensures*

- sensitivity and speed of signaling*. Cell Calcium, 1999. **26**(5): p. 165-71.
133. Morais, S., et al., *Cellulase-xylanase synergy in designer cellulosomes for enhanced degradation of a complex cellulosic substrate*. MBio, 2010. **1**(5).
 134. Zhang, C.C. and H.F. Lodish, *Cytokines regulating hematopoietic stem cell function*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(4): p. 307-11.
 135. Drachman, J.G. and K. Kaushansky, *Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2350-5.
 136. Carver-Moore, K., et al., *Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice*. Blood, 1996. **88**(3): p. 803-8.
 137. Solar, G.P., et al., *Role of c-mpl in early hematopoiesis*. Blood, 1998. **92**(1): p. 4-10.
 138. Tong, W., Y.M. Ibarra, and H.F. Lodish, *Signals emanating from the membrane proximal region of the thrombopoietin receptor (mpl) support hematopoietic stem cell self-renewal*. Exp Hematol, 2007. **35**(9): p. 1447-55.
 139. Louria-Hayon, I., *Signal, transduction, and the hematopoietic stem cell*. Rambam Maimonides Med J, 2014. **5**(4): p. e0033.
 140. Lai, C.Y., et al., *Stage-specific roles for CXCR4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation*. Stem Cells, 2014. **32**(7): p. 1929-42.
 141. Sanuki, S., et al., *A new red fluorescent protein that allows efficient marking of murine hematopoietic stem cells*. J Gene Med, 2008. **10**(9): p. 965-71.
 142. Snoeck, H.W., *Aging of the hematopoietic system*. Curr Opin Hematol, 2013. **20**(4): p. 355-61.
 143. Goldberg, L.R., et al., *The murine long-term multi-lineage renewal marrow stem cell is a cycling cell*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 813-22.
 144. Quesenberry, P. and L. Goldberg, *A revisionist history of adult marrow stem cell biology or 'they forgot about the discard'*. Leukemia, 2017. **31**(8): p. 1678-1685.
 145. Candotti, F., *Gene transfer into hematopoietic stem cells as treatment for primary immunodeficiency diseases*. Int J Hematol, 2014. **99**(4): p. 383-92.
 146. Mukherjee, S. and A.J. Thrasher, *Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects*. Gene, 2013. **525**(2): p. 174-81.
 147. Touzot, F., et al., *Gene therapy for inherited immunodeficiency*. Expert Opin Biol Ther, 2014. **14**(6): p. 789-98.
 148. Kagoya, Y., et al., *A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects*. Nat Med, 2018. **24**(3): p. 352-

- 359.
149. Sockolosky, J.T., et al., *Selective targeting of engineered T cells using orthogonal IL-2 cytokine-receptor complexes*. Science, 2018. **359**(6379): p. 1037-1042.
 150. Kawahara, M., et al., *Selection of genetically modified cell population using hapten-specific antibody/receptor chimera*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **315**(1): p. 132-8.
 151. Mohan, K., et al., *Topological control of cytokine receptor signaling induces differential effects in hematopoiesis*. Science, 2019. **364**(6442).
 152. Wavreille, A.S., et al., *Defining SH2 domain and PTP specificity by screening combinatorial peptide libraries*. Methods, 2007. **42**(3): p. 207-19.
 153. Ishizuka, S., et al., *Designing Motif-Engineered Receptors To Elucidate Signaling Molecules Important for Proliferation of Hematopoietic Stem Cells*. ACS Synth Biol, 2018. **7**(7): p. 1709-1714.
 154. Li, G., et al., *Gab2 promotes hematopoietic stem cell maintenance and self-renewal synergistically with STAT5*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9152.
 155. !!! INVALID CITATION !!!
 156. Hirsch, T., et al., *Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells*. Nature, 2017. **551**(7680): p. 327-332.
 157. Menasche, P., et al., *Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2018. **71**(4): p. 429-438.
 158. Stern, J.H., et al., *Regenerating Eye Tissues to Preserve and Restore Vision*. Cell Stem Cell, 2018. **23**(3): p. 453.

9. 業績

論文発表

1. Saka K, Kawahara M, Ueda H, Nagamune T, Activation of target signal transducers utilizing chimeric receptors with signaling-molecule binding motifs. *Biotechnol Bioeng*, 2012. 109(6): p. 1528-37.
2. Saka K, Kawahara M, Nagamune T, Reconstitution of a cytokine receptor scaffold utilizing multiple different tyrosine motifs. *Biotechnol Bioeng*, 2013. 110(12): p. 3197-204
3. Saka K, Kawahara M, Teng J, Otsu M, Nakauchi H, Nagamune T, Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Biotechnol*, 2013. 168(4): p. 659-65.
4. Saka K, Kawahara M, Nagamune T, Quantitative control of intracellular signaling activity through chimeric receptors incorporating multiple identical tyrosine motifs. *Biotechnol Bioeng*, 2014. 111(5): p. 948-55.
5. Saka K*, Lai CY*, Nojima M, Kawahara M, Otsu M, Nakauchi H, Nagamune T, Dissection of Signaling Events Downstream of the c-Mpl Receptor in Murine Hematopoietic Stem Cells Via Motif-Engineered Chimeric Receptors. *Stem Cell Rev Rep*, 2018. 14(1): p. 101-109. * equal contribution

学会発表

- 1) 坂 晃一郎、河原 正浩、上田 宏、長棟 輝行 「シグナル伝達蛋白質結合モチーフを人工的に配置した新規受容体の構築」 2011年9月 第63回日本生物工学会大会（東京農工大学）
- 2) 坂 晃一郎、河原 正浩、上田 宏、長棟 輝行 「蛋白質結合モチーフを利用した細胞内シグナル伝達分子の活性化制御」 2012年3月 化学工学会第77年会（工学院大学）
- 3) 坂 晃一郎、河原 正浩、上田 宏、長棟 輝行 「受容体の再構成を通じた細胞内シグナル伝達機構の解明」 2012年10月 第64回日本生物工学会大会（神戸国際会議場）

受賞歴

- 1) 坂 晃一郎、河原 正浩、上田 宏、長棟 輝行 「受容体の再構成を通じた細胞内シグナル伝達機構の解明」 2012年10月 第64回日本生物工学会 セルプロセッシング計測評価研究部会 学生優秀発表賞

10. 謝辞

本博士論文の審査にあたり、主査をお務めいただきました東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の河原正浩准教授に深謝いたします。本博士論文の作成にあたっては、度重なるご指導をいただきました。また河原先生には本研究の全ての遂行に関してご支援いただくとともに、研究者としての姿勢を一からご指導いただきました。重ねて御礼申し上げます。同専攻の津本浩平教授、鄭雄一教授、山東信介教授、化学生命工学専攻の鈴木健夫講師の皆様には副査をお務めいただき、本研究の細部にわたりご助言いただきました。ここに深謝の意を表します。

本研究は東京大学工学系研究科化学生命工学専攻において、長棟輝行先生に御指導いただきながら進めた成果になります。長棟先生には本研究に関わる議論の際に、数多くご助言をいただきました。短期的な目標達成だけでなく、応用可能性を含めた幅広い観点から本研究が目指すべき方向性についてアドバイスいただき、研究の価値を改めて見つめなおす機会をいただきました。大変感謝いたします。東京大学先端科学技術研究センターの山口哲志准教授、筑波大学生命環境系の平川秀彦准教授には同研究室に在籍されておりました間、本研究に関するご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

本研究の造血幹細胞研究においては、東京大学医科学研究所との共同研究の機会をいただき、同研究所附属幹細胞治療研究センターの中内啓光教授、大津真准教授にご指導いただきました。素晴らしい研究環境をご提供いただき、洗練された精度の高いアッセイ系なくして説得力の高いデータを作成することはできなかつたと感じております。また、GCDNsamをはじめ研究に必要な試料をご提供いただきました。ここに感謝の意を表します。同研究室の頼さん、大江原さんには幹細胞研究についての知識や詳細な実験手技をご教示いただきました。皆様のおかげで私自身数多くの新たな経験を積むことができました。またご指導いただいている間とても気にかけていただき、医科学研究所内での研究活動にも馴染むことができました。誠に感謝しております。

在学中に長棟研究室に在籍し、研究活動をともにしてきた研究員の皆様には深く感謝いたします。先輩の皆様には研究室での生活や実験手技について一からご指導いただきました。また同期の皆様には最も身近に本研究のご支援をいただき、非常に励みとなりました。大変感謝しております。

最後に、これまで私の研究生活を温かく見守り支援くださった両親に対して深い感謝の意を表します。

