

キメラ受容体を用いた新規 抗体ライブラリー選択法の開発

東京大学大学院工学系研究科
化学生命工学専攻長棟研究室

67144 劉 文海

2009-2/14

1. 緒言.....	5
1.1. 総説.....	5
1.2. 本論文の構図.....	9
1.3. 略語.....	11
2. 背景.....	13
2.1. サイトカインとサイトカインレセプター.....	13
2.2. サイトカインレセプターの活性化.....	15
2.3. 抗原.....	16
2.4. 抗体.....	17
2.5. 抗体-受容体キメラ.....	18
2.6. ライブラリースクリーニング方法.....	19
2.6.1. ファージとファージディスプレイ法.....	19
2.6.2. リボゾームディスプレイ法.....	21
2.7. 筋萎縮性側索硬化症 ALS	22
2.8. 抗体と抗体医薬.....	22
2.9. 細胞内ドメインの配向性変化.....	22
3. 実験材料.....	24
3.1. Ba/F3 細胞.....	24
3.2. Plat-E 細胞 & pMX Vector.....	24
3.2.1. Plat-E 細胞.....	24
3.2.2. レトロウイルスベクターの pMX Vector.....	24
3.3. COS-1 細胞.....	25
3.4. IL-3 と IL-3 レセプター.....	25
3.5. Epo, EpoR 及び EpoR によるシグナル伝達.....	25
3.6. gp130 及び gp130 によるシグナル伝達.....	27
3.7. FL と 抗 FL 抗体 31IJ3 Clone ScFv.....	28
3.8. IRES	29
3.9. 緑色蛍光タンパク質 EGFP.....	29
3.10. 既往の抗体-受容体キメラ.....	29
3.11. hSOD1	30
3.12. ScFv Tomlinson I/J Library.....	31
3.13. Anti-hSOD1 Antibody Library.....	32
4. 抗体-EpoR キメラの EpoR ドメインのシグナル伝達に対する影響.....	33
4.1. 序論.....	33
4.2. 実験方法.....	34

4.2.1.	ベクター構築.....	34
4.2.2.	形質転換.....	47
4.2.3.	抗体-受容体キメラプラスミド抽出.....	47
4.2.4.	Ba/F3 細胞の培養.....	48
4.2.5.	Plat-E 細胞の培養.....	48
4.2.6.	レトロウィルスによる細胞への遺伝子導入.....	49
4.2.7.	Retro Nectin	49
4.2.8.	遺伝子導入手順.....	49
4.2.9.	フローサイトメーターによる遺伝子導入効率の確認.....	50
4.2.10.	フローサイトメーターによる抗体-受容体キメラ表面発現の確認.....	50
4.2.11.	BSA-FL の作製.....	51
4.2.12.	FL dimer の作製.....	51
4.2.13.	BSA-FL による直接選択.....	51
4.2.14.	刺激実験.....	51
4.2.15.	Western blotting による抗体-受容体キメラの発現確認.....	51
4.2.16.	抗体.....	52
4.2.17.	Growth Assay	53
4.3.	実験結果.....	53
4.3.1.	ベクター構築.....	53
4.3.2.	FuGene6 と Lipofectamine による導入率の比較.....	54
4.3.3.	遺伝子導入及び BSA-FL による選択.....	55
4.3.4.	抗体-受容体キメラの BaF3 細胞での発現確認.....	56
4.3.5.	抗体-受容体キメラの BaF3 細胞表面での発現確認.....	56
4.3.6.	BSA-FL に対する抗原依存性増殖.....	57
4.3.7.	表面発現量と抗原応答性の相互関係.....	60
4.3.8.	抗原特異性.....	60
4.3.9.	抗体-受容体キメラ刺激実験.....	61
4.4.	考察.....	64
5.	厳密にリガンド依存性を持つフルオセレイン応答性抗体-受容体キメラの構築. 72	
5.1.	序論.....	72
5.2.	実験方法.....	73
5.2.1.	ベクター構築.....	73
5.2.2.	細胞の培養.....	73
5.2.3.	トロウィルスによる細胞への遺伝子導入.....	73
5.2.4.	Growth Assay と抗原特異性 Growth Assay	73
5.2.5.	刺激実験.....	73
5.2.6.	Western blotting による抗体-受容体キメラの発現確認.....	74

5.3.	実験結果.....	80
5.3.1.	抗体-受容体キメラベクター構築.....	80
5.3.2.	抗体-受容体キメラの BaF3 細胞での発現確認.....	80
5.3.3.	抗体-受容体キメラの BaF3 細胞表面での発現確認.....	81
5.3.4.	BSA-FL に対する抗原依存性増殖.....	82
5.3.5.	表面発現量と抗原応答性の相互関係.....	85
5.3.6.	抗原特異性.....	86
5.3.7.	抗体-受容体キメラ刺激実験.....	87
5.4.	考察.....	88
6.	抗体-受容体キメラを用いた抗 hSOD1 抗体ライブラリーの選択.....	90
6.1.	序論.....	90
6.2.	実験方法.....	92
6.2.1.	抗体-受容体キメラ Sg	92
6.2.2.	Anti-hSOD1 抗体ライブラリー作製.....	92
6.2.3.	抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの構築.....	92
6.2.4.	Electroporation による大腸菌の形質転換及び細胞への遺伝子導入.....	93
6.2.5.	細胞の培養及び抗体-受容体キメラ抗体ライブラリー遺伝子導入.....	94
6.2.6.	フローサイトメーターによる遺伝子導入効率の確認.....	95
6.2.7.	抗体-受容体キメラ抗体ライブラリー選択.....	95
6.2.8.	細胞ゲノム抽出及び抗体断片の増幅.....	95
6.2.9.	抗体発現ベクターの構築.....	95
6.2.10.	Sandwich ELISA 法.....	96
6.2.11.	hSOD1 をビオチン化する.....	96
6.2.12.	FACS により Affinity 分析.....	97
6.2.13.	抗体クローンの配列分析.....	97
6.3.	抗体-受容体キメラを用いた抗 hSOD1 抗体ライブラリーの選択の実験結果....	102
6.3.1.	1st V_H(♀ 134 V_H, V_L, ScFv) 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの構築	102
6.3.2.	ライブラリーから取得した抗体細胞集団の取得.....	102
6.3.3.	Anti-hSOD1 ♀ 134 Library より取得した細胞集団の細胞表面発現.....	105
6.3.4.	抗体発現.....	106
6.3.5.	抗体濃縮.....	108
6.3.6.	抗体 Affinity の ELISA 法による測定.....	109
6.3.7.	抗体 Affinity の FACS 法による測定	111
6.3.8.	取得したクローン VH01, VH02 と VH03 の配列分析.....	112
6.4.	考察.....	113

7. 結言.....	115
8. 発表状況.....	118
8.1. 学術雑誌等に発表した論文.....	118
8.2. 国際会議におけるポスター発表.....	118
8.3. 国際会議における口頭発表.....	118
8.4. 国内学会，シンポジウム等におけるポスター発表.....	119
8.5. 学会，シンポジウム等における口頭発表.....	119
9. 参考文献.....	120
10. 謝辞	133

1. 緒言

1.1. 総説

抗体はその高い抗原特異性を利用して様々な物質に対する検出系に用いられており、任意の抗原に対する高い親和性を持つ抗体断片を簡便に得る方法の開発が望まれている。抗原を特異的に認識する抗体の獲得法として、動物への抗原の免疫やファージディスプレイ法が用いられてきたが、前者は生体毒性の高い抗原を免疫できない、そのままでは単価抗原に対する抗体が得られない、時間がかかる；後者は非特異的結合クローンが取れやすく、操作が煩雑といった欠点がある。そこでわれわれは注目したのは、抗原がその抗原の抗体とは一対一の結合関係になり、同じように細胞から分泌されるサイトカインもそのカイトカインのレセプターとは一対一の結合関係であるという現象である。サイトカインとサイトカインレセプターの結合部位との Affinity により、細胞増殖シグナルが変わる報告(1)を参考にしながら、本研究では抗原存在下でのみ増殖シグナル伝達が生じる抗体-受容体キメラを用いて、抗体-受容体キメラの抗体部分をライブラリー化し、抗体ライブラリーの中から、任意の抗原に対して、増殖活性を指標として高い結合能を持つ抗体を迅速且つ簡便にスクリーニングする手法を開発する。近年、ガンの治療法や環境ホルモンの微量測定法の確立が期待されているが、本研究の手法を確立すれば、原理的にガン抗原、環境ホルモンを含めたあらゆる抗原に対する抗体を獲得でき、医学、工学への幅広い応用が期待できる。

当研究室ではこれまで動物細胞膜上で抗体-受容体キメラを発現させ、抗体の抗原結合能を細胞増殖能に変換する研究が行われてきた。具体的には、マウスの erythropoietin receptor (EpoR)の細胞外ドメインの一部を抗 hen egg lysozyme (HEL) 抗体 HyHEL-10 の可変領域 V_H/V_L で置換した抗体-受容体キメラ V_H -EpoR(HE)/ V_L -EpoR(LE)と、それらの細胞内ドメイン部分を gp130 に置換した抗体-受容体キメラ V_H -gp130(Hg)/ V_L -gp130(Lg)を構築し、IL-3 依存性 Ba/F3 細胞に導入した結果、Lg, Hg 共発現株(Ba/Lg+Hg), LE, Hg 共発現株(Ba/LE+Hg)において、HEL 添加により V_H -HEL- V_L 複合体が形成され、細胞増殖が刺激された(2-4)。

しかし、その手法では同じ細胞表面で同時に二種類の抗体-受容体キメラを共発現させる必要があり、また二種類の抗体-受容体キメラの表面発現量もシグナル伝達に大きな影響を与える。さらに、増殖シグナルの ON/OFF を制御するためには、抗原存在下でのみ V_H , V_L が会合するような性質をもつ必要がある。そこでわれわれが考えたのは、抗体の可変領域 V_H または V_L のみではなく、抗体 Single-chain Fv(ScFv)を使って抗体-受容体キメラを構築することであった。これまでの研究の中では抗 Fluorescein(FL) ScFv を融合した抗体-gp130 キメラを発現した細胞の増殖を二つの FL が DNA 鎖により連結された FL dimer-13 (13-mer)(5)、または、FL 修飾した BSA (BSA-FL: fluorescein conjugated bovine serum albumin)によって促進することができた。しかし、抗原の有無による増殖シグナル ON/OFF 制御は達成されなかった。そこで、本研究の最初の目的としては BSA-FL を用いて、細胞増殖を厳密に ON/OFF 制御でき

るような ScFv を融合した抗体-受容体キメラを構築することにした(Fig. 1-1).

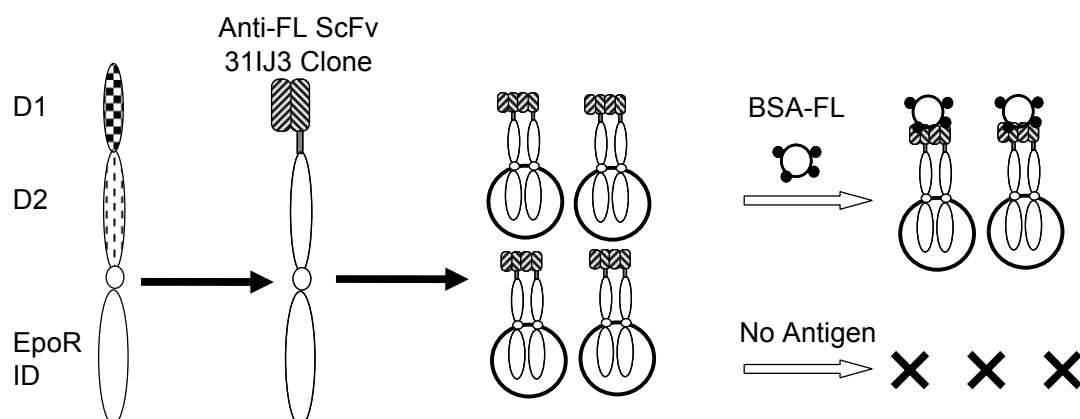


Fig. 1-1 EpoR をベースにした細胞増殖の厳密な ON/OFF 制御のできる抗体-受容体キメラの構築

この研究をさらに発展させるために、細胞増殖の ON/OFF 制御ができた抗体-受容体キメラの抗体部分をライブラリー化し、目的抗原結合性抗体断片を細胞増殖活性を指標としてスクリーニングする系を考案した。この方法では、目的蛋白質と結合する ScFv-受容体キメラを膜に提示している細胞だけが細胞内に増殖シグナルを伝達して増殖できるが、それ以外の細胞は死滅するような系を構築し、目的蛋白質に対する抗体 ScFv を膜提示している細胞だけを短時間にポジティブスクリーニングできる系を開発することを目指した(Fig. 1-2).

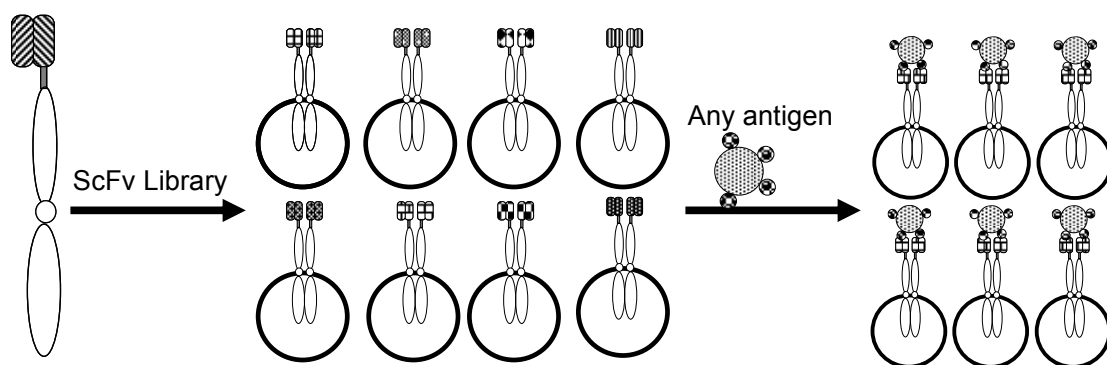


Fig. 1-2 細胞生死による抗体ライブラリー選択法

このような系を構築することができれば、各種の ScFv-受容体キメラのライブラリーを膜に提示している細胞群に目的蛋白質を添加して培養し、そこで増殖してくる細胞を選択するだけで目的蛋白質に対して特異的に結合する ScFv を発現する細胞を取得することができ、数多くの蛋白質に対して特異的に結合する ScFv をハイスループットに作製する技術確立することが可能となる。このような ScFv の高速スクリーニング技術は、ヒト由来の蛋白質のみならず、農薬や環境ホルモンなどの小分子単価

抗原や多価抗原など種々の抗原に対する抗体を培養細胞系で取得することができる極めて汎用性の高い技術であるため、従来の動物を免疫する伝統的な抗体作製方法に代わる、迅速簡便な作製方法となることが期待される。

細胞生死による抗体ライブラリー選択法では生存した細胞に発現されている抗体-受容体キメラにある ScFv は添加した抗原に Affinity を持つと予測できる。Fig. 1-3 に示したように、生存細胞のゲノムを抽出して、Genomic PCR 法により抗体断片を増幅できる。増幅された抗体断片を発現ベクターに組み込ませて、COS-1 細胞株により抗体を発現できる。発現された抗体の抗原に対する Affinity は Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法により測定できる。

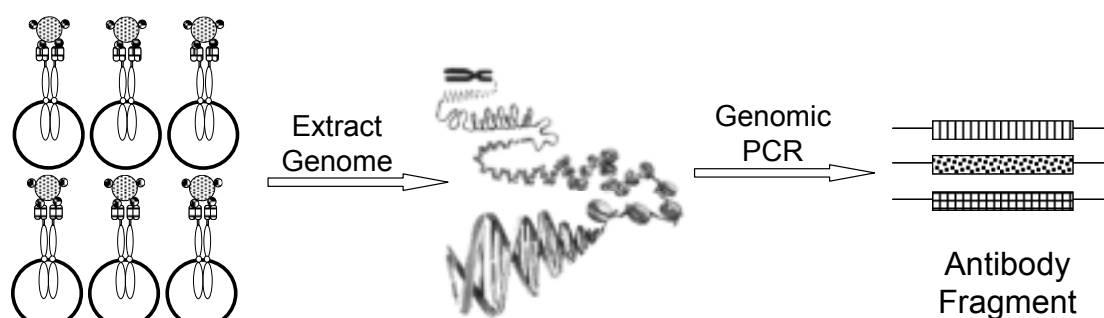


Fig. 1-3 生存細胞のゲノムから抗体断片を取得する手順

具体的な実験方針であるが、まず、細胞増殖 ON/OFF を厳密に制御できる抗体-受容体キメラを構築するために、モデル系として抗原 BSA-FL に対する抗体 ScFv 31IJ3 Clone を利用して、EpoR の細胞外ドメインに ScFv を付加した種々の抗体-受容体キメラを構築した。当研究室におけるこれまでの研究では、EpoR の細胞外 D2 ドメインに ScFv を融合した抗体-受容体キメラを構築した。構築した抗体-受容体キメラはリガンド非存在下でも増殖シグナルを伝達してしまっており、リガンド非依存性細胞増殖活性がみられてしまった。これは、抗体-受容体キメラがリガンド非結合時でもダイマー化し、活性化状態になっていると考えられる。さらに、細胞内ドメインを EpoR 細胞内ドメインから gp130 細胞内ドメインに置換した抗体-受容体キメラを構築したが、構築した抗体-受容体キメラはリガンドのありなしに関わらず死滅してしまっていた。そこで、本研究ではまず、抗原 BSA-FL の結合時のみ増殖活性を誘導可能な抗体-受容体キメラの構築を行った。まず、細胞外ドメインとして、これまで EpoR D2 を常に用いてきたが、この細胞外ドメインの構造を最適化することを試みた。すなわち、EpoR の細胞外ドメインに抗 FL ScFv を付加し、さらにこの FL 応答性抗体-受容体キメラをベースとして、EpoR の細胞外 D1, D2 ドメインの一部または全部を除去した抗体-受容体キメラを構築した。さらにそれらの抗体-受容体キメラをベースとして、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間にアラニン残基を入れて細胞内ドメインの角度を変化させ、受容体鎖間の相互作用やコンホメーションを変化させた(6)。それぞれの抗体-受容体キメラを血球細胞株で発現させたところ、抗原濃度による増殖依存性の差が見られたことから、シグナル伝達における EpoR の各ド

メインの役割分析とシグナル伝達機構に対する影響の解明ができることが示唆された。さらに、構築した抗体-受容体キメラの細胞外ドメインと結合できる複数のリガンドを使って刺激実験を行った。シグナル伝達経路における主な蛋白質である Janus kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)と extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)のリン酸化状況を調べた。その結果、構築した抗体-受容体キメラに存在する各ドメインのシグナル伝達に対する影響を分析できた。

本研究の最初の目的は細胞増殖 ON/OFF 制御のできる抗体-受容体キメラの構築であるが、EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラでは抗原依存性細胞増殖の厳密な ON/OFF 制御を実現できなかった。そこで、構築した抗体-受容体キメラの細胞内ドメインを EpoR 細胞内ドメインから gp130 細胞内ドメインに置換した抗体-受容体キメラを構築した。作製した抗体-受容体キメラの中で、EpoR の細胞外ドメインを ScFv で完全に置換し、EpoR 膜貫通ドメイン、gp130 細胞内ドメインを有する抗体-受容体キメラ Sg は BSA-FL の有無によって増殖シグナルの ON/OFF が最も明確となることが分かった。

モデル系として、細胞増殖シグナルの ON/OFF 制御のできる抗体-受容体キメラ Sg の ScFv 部分をライブラリー化して、抗原による抗体ライブラリー選択を行った。本研究では抗原として家族性の筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子である human superoxide dismutase 1 (hSOD1)を選び、hSOD1 を使って免疫したマウスの脾臓細胞から RT-PCR 法を用いて抗体 ScFv 部分を増幅した ScFv ライブラリー (Anti-hSOD1 ScFv Library), V_H または V_L 部分のみ増幅した V_H または V_L ライブラリー (Anti-hSOD1 V_H Library と Anti-hSOD1 V_L Library) を作製した(兵庫医科大学藤原範子先生による作製)。これらのライブラリーを BSA-FL の有無によって増殖シグナルの ON/OFF が最も明確であった抗体-受容体キメラ Sg の ScFv 部分と置換して、抗体-受容体キメラライブラリーを構築した。これらの抗体-受容体キメラライブラリーを Pro-B 細胞株である Ba/F3 細胞表面で発現させ、hSOD1 の添加培養による抗体ライブラリー選択を行った。hSOD1 に応答して増殖した細胞に発現している抗体-受容体キメラの抗体部分は抗原 hSOD1 に対する Affinity を持っていることが予想される。そこで、増殖した細胞を回収してゲノムを抽出した。抽出したゲノムをテンプレートにして Genomic PCR により抗体断片を増幅し、DNA 配列を確認した。取得した抗体断片を発現ベクターに組み込ませて、COS-1 細胞株を用いて可溶性抗体を発現させた。取得した抗体クローンの hSOD1 に対する結合性を Sandwich ELISA 法により評価した結果、取得した抗体クローンのうち一部は hSOD1 に対する結合能力を持つことが分かった。

本研究の目的は、抗体可変領域 ScFv が抗原存在下で安定な複合体を作ることと、受容体が二量体を形成して増殖シグナルを伝達するという性質を利用し、目的蛋白質に対する抗体 Fv を膜表示している細胞だけを短時間にスクリーニングできる系を開発することにある。従来の動物に依存する抗体作製にかわる画期的なものであり、医学や工学的な応用可能性を秘めた先駆的な研究である。本手法は増殖活性を指標としたポジティブ選択であるため、従来の手法と比較して、非特異的結合によるバックグラウンドが少なく、操作が簡便であることが利点である。また、選択後に Cre-loxP システムを用いて抗体分泌細胞に

変換する系が成功すれば、抗体断片の選択・生産一貫システムを構築することが可能となり、本法は新規性・有用性ともに高い。

抗体は特異的な抗原を高い結合定数で認識するという性質を持ち、医学的応用においては、標的細胞に薬を運んだり治療を施したりする際の標的指向性を担う分子としてニーズが高い一方、ガンなどの治療への応用の可能性もある。さらに、工学的応用においては、極めて低濃度の環境ホルモン分子を特異的かつ高感度に迅速測定する手法の確立ができる。ワンステップで選択できることによる操作の簡便性もあり、本手法は抗体の抗原結合性を増殖活性に変換する点が他の研究と比較して独創的である。

1.2. 本論文の構図

本論文のメインとしては七つの部分から構成される (Fig. 1-4)、そのほかに発表状況、参考文献と謝辞になっている。

第一部分では、本研究の目的に関して大筋にまとめた。第二部分では、本研究を行う背景について詳しく説明した、それに本研究に使用した主な実験材料などについては第三部分で説明した。

第四部分では、本研究で構築する抗体-受容体キメラのベースになる EpoR ドメインが抗体-EpoR キメラのシグナル伝達に及ぼす影響を調べた。得た知見に基づいて、本研究の最初の目的であり、厳密にリガンド依存性を持つフルオレセイン応答性抗体-受容体キメラの構築を説明したのは第五部分である。

さらに、その研究を進めて、細胞増殖を厳密に ON/OFF 制御できた抗体-受容体キメラの ScFv 部分をライブラリー化して、抗 hSOD1 抗体ライブラリーを選択した実験を第六部分で説明した。以上に関するまとめを第七部分で説明した。

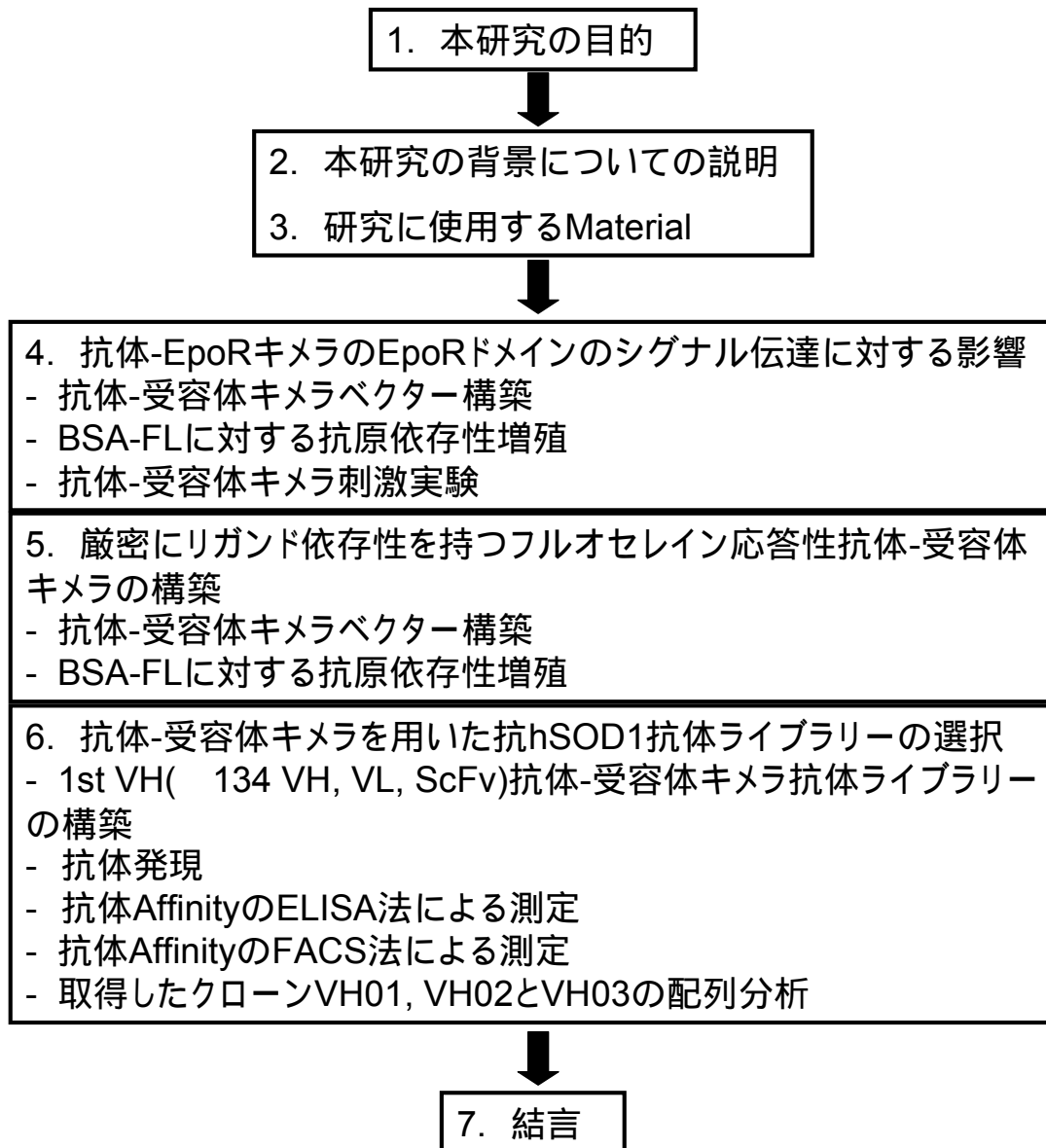


Fig. 1-4 本論文の構図

1.3. 略語

13-mer: FL dimer-13

ALS: amyotrophic lateral sclerosis

AMEGA: Antigen-MEDiated Genetically modified cell Amplification

BSA-FL: fluorescein conjugated bovine serum albumin

CCA: congenital contractural arachnodactily

CDR: complementarity determining region

CNTF: ciliary neurotrophic factor

CSF: colony stimulating factor

CT-1: cardiotrophin-1

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

ECL: enhanced chemiluminescence

EGF: epidermal growth factor

EGFP: enhanced green fluorescent protein

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMCV: encephalomyocarditis virus

EMP: Epo-mimetic peptides

Epo: Erythropoietin

EpoR: erythropoietin receptor

ERK2: extracellular signal-regulated kinase 2

FBS: fetal bovine serum

FDA: Food and Drug Administration

FITC: fluorescein isothiocyanate

FL: Fluorescein

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HEL: hen egg lysozyme

HERES: 4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid

HIF: hypoxia inducible factors

HRP: horseradish peroxidase

hSOD1: human superoxide dismutase 1

IL-3: Interleukin-3

IRES: internal ribosomal entry site

JAK2: Janus kinase 2

LIF: leukemia inhibitory factor

LTR: long terminal repeat

MFS: Marfan syndrome

OSM: oncostatinM

PBS: phosphate-buffered saline

PDGF: platelet-derived growth factor

PE: Phycoerythrin

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

ScFv: Single-chain Fv

SH2: Src-homology 2

STAT3: signal transducer and activator of transcription 3

STAT5: signal transducer and activator of transcription 5

SVAA: supra-ventricular aortic stenosis

TGF- β : transforming growth factor

TNF: tumor necrosis factor

2. 背景

2.1. サイトカインとサイトカインレセプター

サイトカインとは、細胞という意味の「サイト」と、作動因子という意味の「カイン」の造語である。当初、血球系細胞に作用するリンホカインやモノカインなどを示したが、現在ではインターロイキン(interleukin : IL), インターフェロン(interferon : IFN), コロニー刺激因子(colony stimulating factor : CSF), 腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor : TNF), トランスフォーミング増殖因子(transforming growth factor : TGF- β), 上皮増殖因子(epidermal growth factor : EGF), 血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor : PDGF)などを含める(7)。サイトカインは、分子量8千~10万の糖蛋白であり、ホルモンと異なり主として産生局所で、pg~ng/mlの微量で作用する因子である。サイトカインの機能は免疫系の調節、炎症反応の惹起、抗腫瘍作用などがある一方、細胞増殖、分化、抑制といった生体の恒常性維持に重要な役割を果たす物質でもある。サイトカインの情報は、細胞によって産生、分泌されたものが、それに対するレセプターを発現する細胞と結合し伝達される。そのようなサイトカインレセプターの結合によって発揮される機能は極めて多様で、サイトカイン産生細胞、レセプター発現細胞、その結合による機能発現には、複雑なネットワークが存在し、互いに機能を相補し、制御することによって生体の恒常性を維持している。

サイトカインの作用には、重複性と多様性という2つの大きな特徴があるが、それはサイトカインレセプターの構造および細胞内のシグナル伝達系に起因している。しかしながら、1つのサイトカインに対するレセプターが細胞ごとに異なるわけではなく、各サイトカインには限られた数の特異的レセプターしか存在しない。したがって、サイトカインの示す機能的多様性は、サイトカインレセプターの多様性ではなく、細胞内のシグナル伝達機構の違いを反映したものと考えられる。サイトカインレセプターはその構造上の特徴から、Fig.2-1に示したように、I型、II型、III型サイトカインレセプター、ケモカインレセプター、チロシンキナーゼ型レセプター、セリン/スレオニンキナーゼ型レセプターなどに分類されている(8)。

1, I型サイトカインレセプターは、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、また細胞外には、ファイブロネクチン(FN)様構造の繰り返し配列をもっている。多くの場合2~3個のサブユニットにより構成されているが、シグナル伝達に関与するサブユニットは、複数のレセプター間で共有されている。たとえばIL-2レセプター(IL-2R α , β , γ)は、異なるサイトカインレセプター間でサブユニットを共有している。すなわち複数の異なるサイトカインが、共通のレセプターサブユニットを介して、細胞に共通のシグナルを送れることになる。これがサイトカイン作用の重複性の原因となっている。代表としてインターロイキン(IL) 2~7, 9, 11~13, 15, G-CSF(顆粒球・コロニー刺激因子)などのサイトカインレセプターがある(9, 10)。

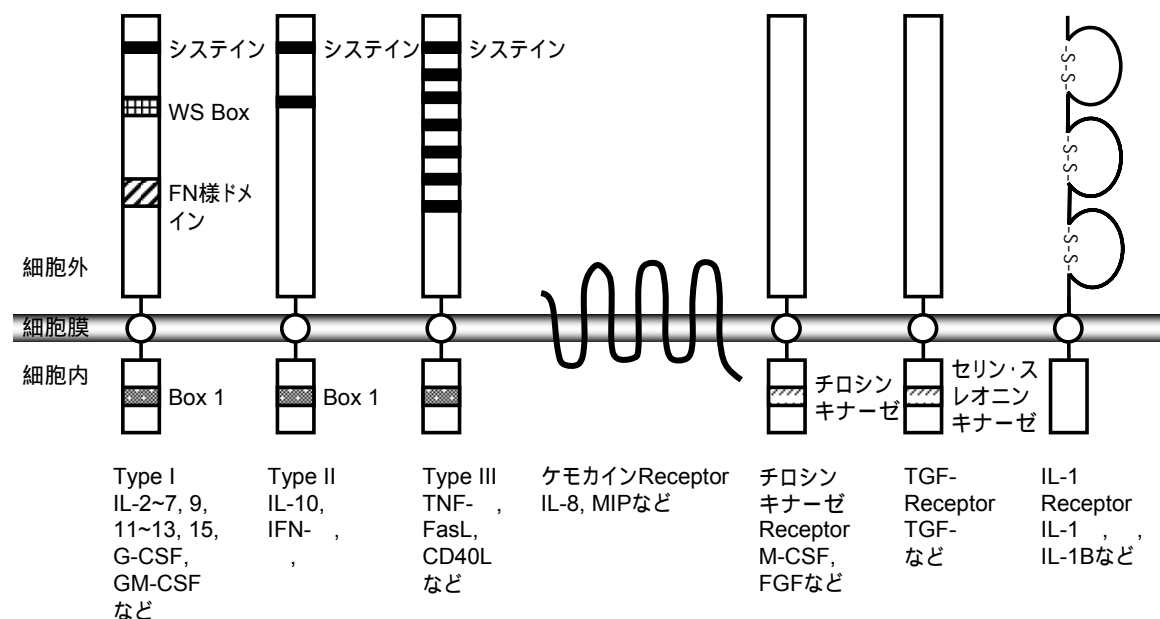


Fig. 2-1 サイトカインレセプターの分類と構造の特徴

2, II型サイトカインレセプターは、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型サイトカインレセプターと構造上の類似点がある。代表としてインターフェロン(IFN)- α , β , γ やIL-10などのサイトカインレセプターがある(11, 12)。

3, III型サイトカインレセプターの細胞外ドメインは、システイン残基の豊富なユニットにより構成されて、このユニットには各レセプター間で相同性がある(13)。TNFレセプターIおよびFasの細胞内ドメインにはdeath domainと呼ばれる配列が存在し、細胞死の誘導に深く関わっている。III型サイトカインレセプターファミリーは、TNF/Fasレセプターファミリーとも呼ばれ、TNF（腫瘍壊死因子）レセプターやFasをはじめとする数多くのものが含まれている。

4, ケモカインレセプターは現在までに約15種類知られており、すべて7回膜貫通型のGタンパク質結合型レセプターである(14)。最近一部のケモカインレセプターが、HIVのレセプターの一部であることも判明し注目を集めている。またHIV感染を抑制するケモカインも知られている。哺乳動物が進化の過程で獲得したものであり、白血球を速やかに誘導することが、さまざまな環境で生体防御能を発揮し生き抜くため、有利だったからかもしれない。

5, チロシンキナーゼ型レセプターは、M-CSF（マクロファージ/コロニー刺激因子）やFGF（線維芽細胞増殖因子）などのレセプターであり、細胞内にチロシンキナーゼ部位を有している。

6, セリン／スレオニンキナーゼ型レセプターはTGF- β （腫瘍増殖因子）レセプターファミリーがある。

7, IL-1レセプターはIL-1 α , β , IL-1Bなどのレセプターファミリーがある。

2.2. サイトカインレセプターの活性化(15)

多くのサイトカインの機能発現には JAK-STAT 経路が最も重要である。サイトカイン受容体が JAK キナーゼを活性化し、JAK 下流には STAT と呼ばれる転写因子が存在し、遺伝子発現の調節を直接になっている。JAK および STAT はファミリーを形成しており、4 種類の JAK キナーゼ(JAK1, JAK2, JAK3, Tyc2)と 7 種類の STAT (STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B, 6) が同定されており(16-20)、これらの組み合わせによってサイトカイン作用の多様性が表現されるのではないかと考えられる。

レセプターの活性化においてレセプターダイマーの形成は重要であり、リガンドの結合によるレセプターダイマーが形成される。Fig.2.2 には JAK-STAT シグナル伝達模式を説明した。サイトカインレセプターの細胞膜直下には JAK キナーゼがプレ結合しており、サイトカインレセプターダイマー化の同時に JAK キナーゼ同士が近づき、JAK にあるチロシン残基のリン酸化が起こる。JAK キナーゼが互いに活性化しあうと、活性化された JAK はレセプターにあるチロシン残基をリン酸化して、SH2 ドメインを持つタンパク質のドッキングサイトになる。STAT は SH2 ドメインをもつ蛋白質であり、STAT 蛋白質 C 末端にあるチロシン残基は活性化 JAK によりリン酸化され、リン酸化された STAT はレセプターから解離して、ダイマーまたはヘテロダイマーを形成し核へ移行する。遺伝子の発現などに関与する。

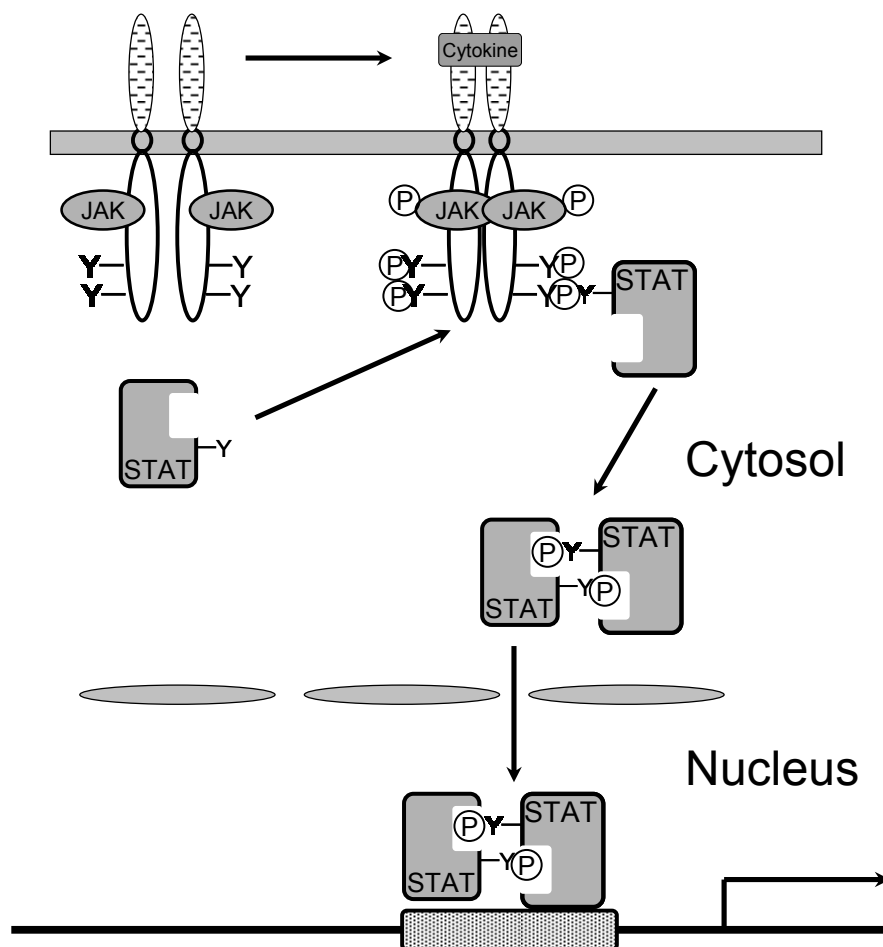


Fig. 2-2 サイトカインレセプターのシグナル伝達機構

JAK-STAT 経路のほかに ERK 経路によるシグナル伝達もメイン経路の一つである。ERK 経路には、Ras, c-Raf, MEK1/2, ERK1/2 (ERKs), Rsk1/2/3 や転写因子 (Elk や Ets など) を含む多くのシグナル伝達タンパク質が関わっている(21)。ERK ファミリーメンバーは、MAP/ERK キナーゼや MEK に分裂促進因子や他の刺激に反応してチロシン残基やスレオニン残基をリン酸化することで活性化される。ERK は転写因子、プロテインキナーゼやフォスファターゼ、細胞骨格因子、アポトーシス調節因子、また多くの他のシグナル伝達分子を含む多数の下流分子をリン酸化することにより、分裂促進シグナルに応答する(22)。ERK 経路は多くのヒトの腫瘍において注目され、それ自身が抗癌剤開発の研究対象となっている(23)。それに関する報告では、B-Raf または N-Ras において変異が活性化すると、多くの皮膚メラノーマにおいて ERK/MAPK 経路の活性化が起こる(24)。ERK/MAPK 経路を阻害すると Bcl-2 ファミリーメンバーの Bad および Bim が脱リン酸化され、カスパーゼが活性化され、最終的にはアポトーシスの誘導を通じてメラノーマ細胞を消滅させる。さらに、最近 ERK 経路の分子を標的とする有力な小分子阻害剤群が開発され、治療における研究が盛んに行われている(25)。

そのほかに AKT 経路のあり、AKT (または PKB) シグナル伝達経路は、細胞増殖や生存、細胞サイズや栄養素利用への応答性、グルコース代謝、組織浸潤および血管新生など多くの細胞プロセスを調節できる。AKT は細胞外 (成長因子およびインスリン) および細胞内 (受容体チロシンキナーゼ, Ras および Src) シグナルの伝達経路における主要な節点として機能して、細胞内において基本的な細胞プロセスを調節している。セリン/スレオニンキナーゼである AKT は、AKT 経路における主要分子であり、ほ乳類において 3 つのアイソフォーム (AKT1, AKT2 および AKT3) として存在し、PIP3 リン脂質セカンドメセンジャー産生に寄与する主要な脂質キナーゼ標的である PI3K の下流に位置している。AKT の活性化には、プレクストリン相同領域を通じた PIP3 への結合や PDK1 による Thr308 での AKT 活性化ループのリン酸化、および PDK2 による Ser473 での C-末端内のリン酸化が必要である(26)。AKT 経路の変化、特に AKT 自身における変化が多くのヒト悪性疾患で見られている(27)。多くの腫瘍および腫瘍細胞において AKT タンパク質の発現および活性の上昇が見られ、また、AKT 自身を調節する多くのタンパク質もしばしば癌において変異していることは報告されている。AKT シグナル伝達の阻害は、AKT の上昇を伴う腫瘍細胞の増殖抑制やアポトーシスを引き起こす。ある腫瘍が生存/増殖に際して AKT シグナル伝達に依存することが観察されたことは、癌治療に対して大きな意味を持っており、選択的に腫瘍細胞を殺す可能性が示唆されている(28)。

2.3. 抗原

抗原とは、免疫細胞上の抗原レセプターに結合し、免疫反応を惹起する物質である。抗体やリンパ球の働きによって生体内から除去されることになる(29)。通常、細菌やウイルスなどの外来病原体や人為的な注射などで体内に入るタンパク質などが抗原

となるが、自己免疫疾患では自分の体を構成している成分を抗原と認識して免疫反応が起きてしまう。また、アレルギー反応を惹起する抗原を特にアレルゲンと呼ぶことがある。抗原に対して有効な反応性を持った抗体を産生するためには多くの場合 T 細胞の関与が必要であるが、多糖類などのように抗体産生に T 細胞を必要としない抗原もある。抗原は多くの場合高分子物質であり、抗原の比較的小さな一部分が 1 分子の抗体と結合する。この抗体結合部分を抗原のエピトープ(epitope)と呼ぶ。エピトープは抗原性のための最小単位であり、抗原決定基(antigenic determinant)とも呼ばれる。エピトープは T 細胞レセプターに結合する抗原部分を指すこともあり、その場合は特に T 細胞エピトープと呼ぶ。

2.4. 抗体(30, 31)

抗体とは、特定の抗原に対する免疫応答によって生体内に作られ、その抗原に特異的に結合する機能タンパク質分子である。多くの場合、結合によって抗原を生体内から除去するように働く。抗体は抗原に結合するという機能を重視した名称で、物質的には免疫グロブリンと呼ばれるタンパク質と同一である。

免疫グロブリン分子は、分子ごとに大きな変異を作り出すことで多様な抗原に結合することができる抗原結合領域 (V 領域) と、あまり変異のない定常領域 (C 領域) からなる。定常領域の構造のちがいににより IgG, IgA, IgM, IgD, IgE の 5 種類のクラスに分類される。それぞれのクラスの免疫グロブリンは大きさや生理活性が異なり、IgA は粘膜分泌型の分子であり、IgE は肥満細胞に結合してアレルギー反応を引き起こす。さらにヒトの場合、IgG には IgG1 ~ IgG4 の 4 つのサブクラスが、IgA には IgA1 と IgA2 の 2 つのサブクラスがあり、それぞれ少しずつ構造が異なっている。IgM, IgD, IgE にはサブクラスはない。

抗原に結合する基本単位は重鎖(Heavy chain)と軽鎖(Light chain)の二本のポリペプチド鎖がジスルフィド結合で結びついたヘテロダイマーで、代表的な γ -グロブリンは、そのヘテロダイマーがさらに二つ結合したヘテロテトラマーの構造をもつ。Fig. 2-3 に示してあるように、最も単純な抗体は Y 字形の分子で、同一の抗原結合部位 (antigen-binding site) が両腕の先端に 1 つずつついている。抗体分子の基本的構造単位は、同一の L 鎖(light chain)2 本と、同一の H 鎖(heavy chain)2 本からなる 4 本のポリペプチド鎖であり、その鎖が非共有結合と共有結合 (ジスルフィド結合) により結びあわされている。分子は左右対称で、それぞれに同じ抗原結合部位がある。通常、L 鎖と H 鎖が共同し、抗原結合部位を形成している。L 鎖と H 鎖のアミノ末端側には、約 110 個のアミノ酸残基からなる可変領域があり、それに続いて、L 鎖では可変領域と同じ大きさ、H 鎖ではその 3 倍または 4 倍の大きさの定常領域がある。各鎖は、同じような形に折り畳まれたドメインの反復からなっている。L 鎖は 1 つの可変ドメイン(V_L)と 1 つの定常ドメイン(C_L)からできており、H 鎖は 1 つの可変ドメイン(V_H)と 3 つまたは 4 つの定常ドメイン(C_H)からできている。L 鎖と H 鎖の可変領域のアミノ酸配列の変化は、大部分が数箇所の小さな超可変領域に限られている。この部分は表面に突出したルー

プを作り，これが集まって抗原結合部位を形成している．

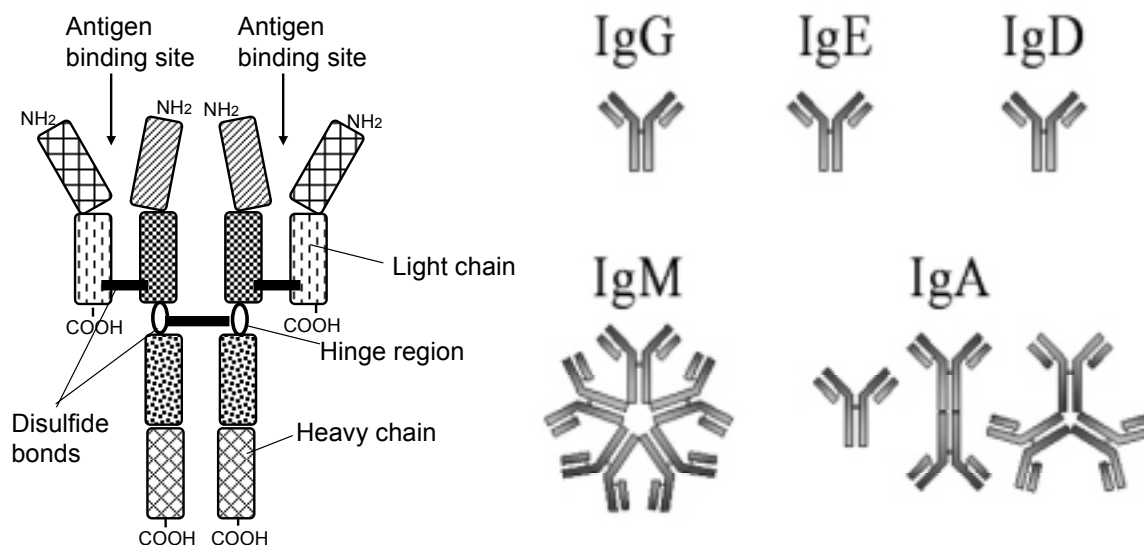


Fig. 2-3 抗体の種類及び Y 型構造

2.5. 抗体-受容体キメラ

目的遺伝子が導入された細胞を特異的に増幅させる場合では，通常では抗生物質選択を用いるが，抗生物質の細胞毒性などの問題があり，*in vivo* での応用には限界がある．近年，変異サイトカイン受容体を用いた選択法が報告された(32, 33)．彼らの方法では C 末端切除した EpoR を目的遺伝子と共に細胞に発現させ，細胞は Epo の添加により特異的に目的遺伝子導入細胞を増殖させる手法であった．Epo は自然界に存在であるサイトカインであり，ほかの生理機能も持っているので，*in vivo* での副作用が懸念される．その問題を解決するために，FKBP12-受容体キメラ(34-36)，G-CSFR-エストロゲン受容体キメラ(37)と Gyrase B-G-CSFR キメラ(38)などいろいろな受容体キメラが開発された．この中で，FKBP12-受容体キメラは化学誘導因子に応答して，細胞増殖シグナル伝達できるので，人工受容体ダイマーとして多くの場合で利用されている．

上田らの報告では初めて抗体-EGFR キメラを用いて抗原濃度を EGFR のリン酸化レベルで定量するバイオセンサーを開発した(39)．さらに，抗原抗体の相互作用を利用して，抗体-受容体キメラを用いてサイトカインレセプターの機能を模倣できる可能性が示唆された．

本研究室においては，リガンドの多様性を考慮し，リガンドとその結合部位に抗原抗体反応を利用した Antigen-Mediated Genetically modified cell Amplification(AMEGA)システムを開発した(40)．マウス EpoR の細胞外ドメインの一部を抗 HEL 抗体 HyHEL-10 の可変領域で置換した抗体-受容体キメラ V_H -EpoR (HE) / V_L -EpoR (LE) と，それらの細胞内ドメインを gp130 に置換した V_H -gp130 (Hg) / V_L -gp130 (Lg)，また，同様に，マウス EpoR の細胞外ドメインの一部を抗 FL 抗体の ScFv で置換した ScFvE と，その膜貫通ドメイ

ンと細胞内ドメインを gp130 に置換した ScFvg が構築された (Fig.2-4)

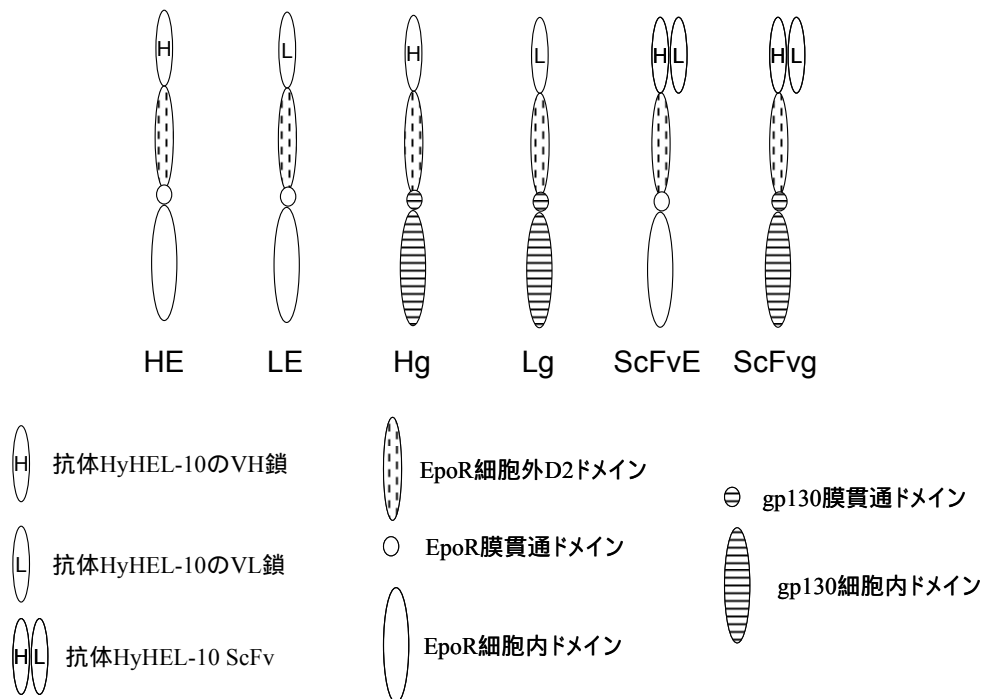


Fig. 2-4 抗体-受容体キメラ HE, LE, Hg, Lg, ScFvE と ScFvg

IL-3 依存性 Ba/F3 細胞に導入した結果, Hg・Lg 共発現株 (Ba/Hg+Lg), Hg・LE 共発現株 (Ba/ Hg+LE) において, HEL 添加により V_H -HEL- V_L 複合体が形成され, 細胞増殖が刺激されることがこれまでに確認されている. また, ScFvg 発現株 (Ba/ScFvg) において, BSA-FL 添加により細胞増殖が刺激されることも確認されている.

しかし, どの細胞株においてもリガンド濃度依存的に細胞は増殖するものの, リガンド非添加での増殖 (background 活性) が見られた. さらに, Ba/Lg+Hg, Ba/LE+Hg の V_H に変異を加えたところ, リガンド濃度依存性がなくなったり弱められたりした. これは, EpoR が Epo 非結合時で pre-dimer 化すると同様に, 抗体-受容体キメラもリガンド非結合時で pre dimer 化し, しかも wild type EpoR では pre-dimer 時では活性化されないように制御されているが, 抗体-受容体キメラでは構造の違いからか, pre-dimer 時でも活性化されてしまうためと考えられる. background 活性がなくなれば, これらの抗体-受容体キメラを用いたライブラリー選択は難しい. そこで本研究の最初の目的としては background 活性のない抗体-受容体キメラを構築することにした.

2.6. ライブラリースクリーニング方法

2.6.1. ファージとファージディスプレイ法(41)

ファージ は細菌に感染するウィルスの総称である. Fig.2-5 に T4 ファージを示してある. その大きさは 25~200nm 程度である. この尾は細菌の細胞外に発達した莢膜や, ペプチドグリカンから成る細胞壁を突破して, 細胞内に核酸を送り込む機能を持

っているとされている。

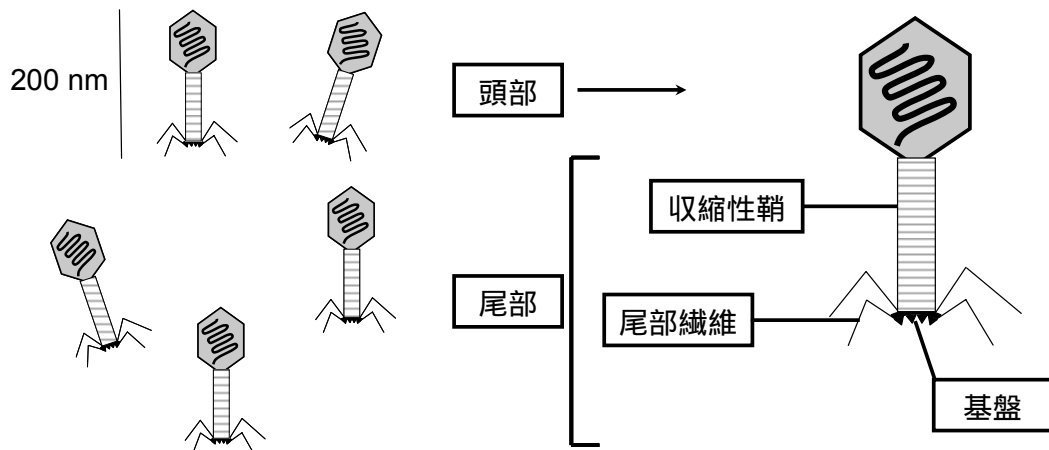


Fig. 2-5 T4 ファージ

バクテリオファージ fd や M13 といった繊維状ファージのマイナー外皮蛋白質 pIII, もしくはメジャー外皮蛋白質 pVIII に, ランダムな配列のペプチドを融合して発現させることにより, ファージ粒子表面にランダムな配列のペプチドを発現したライブラリーを得ることができる. 十分な量のファージ粒子を得た後, 固定化リガンドなどを用いて特異的に結合するファージを選択する. 選択したファージを再び増殖, 選択, というパニングサイクルを繰り返していき (Fig. 2-6), リガンドと特異的, かつ強く結合するファージを選び出す. 得られたファージ DNA の塩基配列決定によりペプチドのアミノ酸配列を明らかにすることができる. しかし, 大きな, しかも活性のある蛋白質分子をディスプレイすることが困難であり, 選択濃縮の問題や単離されたあと, 再度, 宿主感染を経て, 細胞破碎や精製の手法をとらねばならないなど, まだまだ解決せねばならない点も多々残されている.

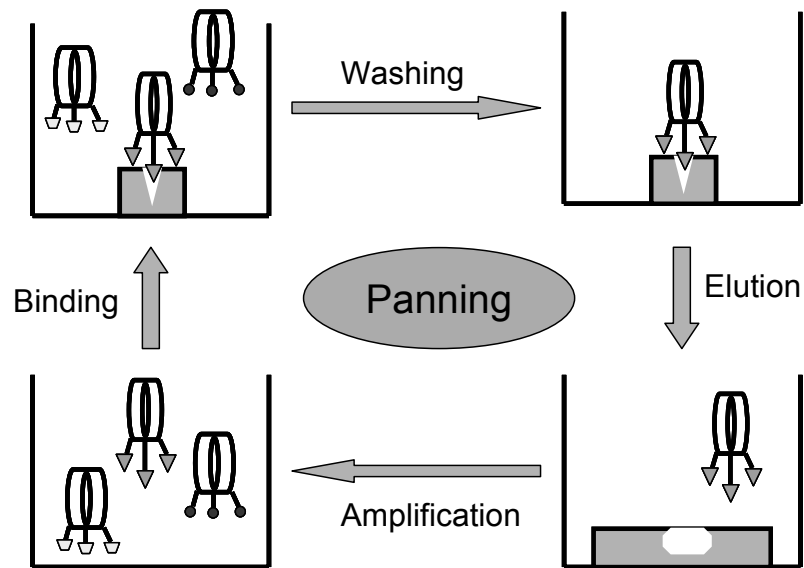


Fig. 2-6 ファージディスプレイ法でのパニングサイクル操作

2.6.2. リボゾームディスプレイ法(42)

リボゾームディスプレイ法は、全てのステップを*in vitro*で行うライブラリースクリーニング法である。ランダムDNAライブラリーを大腸菌のS30無細胞転写/翻訳系に添加してペプチドを合成し、低温、高マグネシウムイオン濃度の条件下で、タンパク質合成阻害剤を添加するとmRNA上でリボゾームが動けなくなり数珠繋ぎになったもの(ポリソーム)が得られる。それぞれのリボゾームは合成途中のペプチド鎖をつけており、この状態はかなり安定しているので、固定化リガンドなどに結合させる。吸着しなかった複合体を洗い流した後、EDTAを添加することによって、固定化リガンドに特異的に結合しているmRNA-ribosome-protein複合体のmRNAを抽出し、逆転写し、PCRで増幅させる(Fig. 2-7)。この操作を繰り返すことにより、リガンドと特異的かつ強く結合するタンパク質の遺伝子を得ることができる。そのDNAの塩基配列を決定することによりペプチドのアミノ酸配列を明らかにすることができる。この方法の特徴は、ライブラリーサイズをきわめて大きくできる($10^{14} \sim 10^{15}$)こと、また非天然アミノ酸を結合させたtRNAを用いることにより非天然アミノ酸を含むペプチドライブラリーを構築できる。

しかし、*in vitro*での操作であるがためにタンパク質が細胞内環境での場合と同じようなフォールディングができるのは保障できない問題点もあり、また、ファージディスプレイ法と同様に繰り返しサイクルがあるため操作が煩雑であるなどの問題点もある。

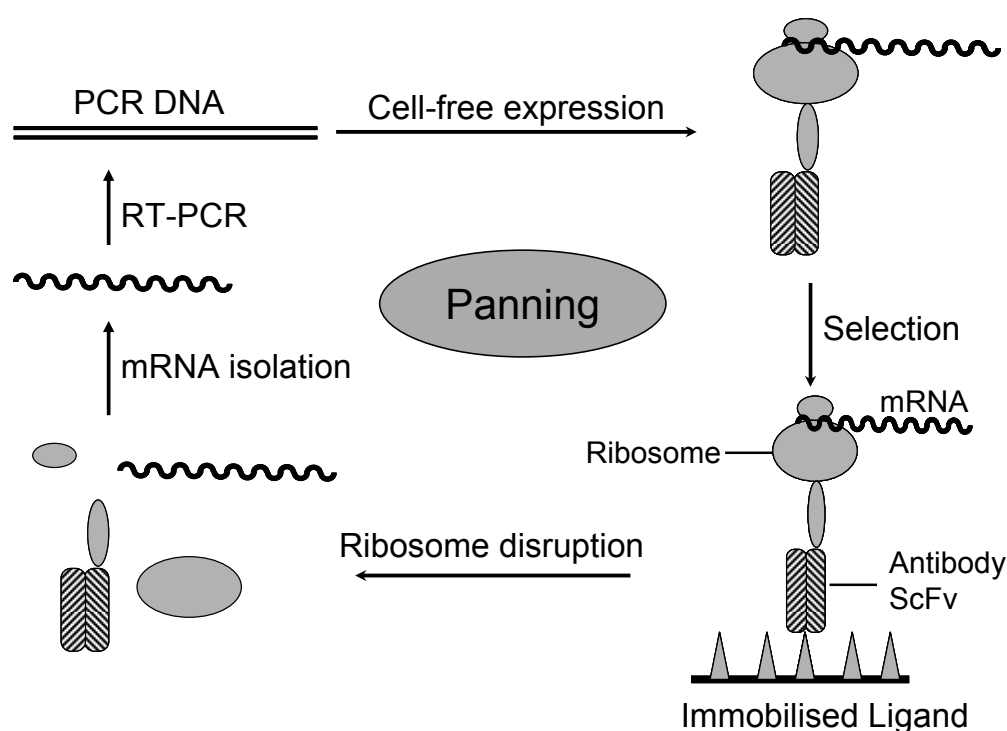


Fig. 2-7 リボゾームディスプレイ法でのパニングサイクル操作

2.7. 筋萎縮性側索硬化症 ALS (amyotrophic lateral sclerosis)

ALS(43)は主に40～60歳で発病し、上位、下位の両運動ニューロンが選択的にかつ進行性に変性消失していく原因不明の神経難病である。筋萎縮と筋力の低下、線維束性収縮が主体で、構語障害、嚥下障害、呼吸障害、歩行障害などが生ずるが、一般に眼球運動、膀胱直腸、感覚や知能には影響がないという特徴がある。病勢の進展は比較的はやく、人工呼吸なしでは発症後2～4年で死亡する。90%程度が遺伝性を認められない孤発性である。残り10%程度の遺伝性ALSでは、一部の症例に原因遺伝子が同定されている。遺伝性ALSの20%程度を占めるとされる、常染色体優性遺伝のALS1は21番染色体上のhSOD11 (スーパーオキシドジスムターゼ1遺伝子) に突然変異がある(44, 45)。ALSに関する研究結果により、現在までに次のような病態が明らかにされた。1. タンパク質の異常凝集；2. 異常タンパク質の分解系の異常；3. ミトコンドリアの異常；4. かつて血管拡張因子と考えられていたタンパクの機能異常；5. スーパーオキシドの過剰産生による(周辺細胞を含む)細胞死。ALSでは、運動神経細胞がおもに障害され、その数は徐々に減っていつてしまう。運動神経細胞をどうやって守るかということが、現在もALS治療法開発の中心的なテーマである。そこへ最近、失われた神経細胞をうまく補充して元のように戻すという全く新しい神経再生治療法開発の可能性が注目されている(46, 47)。

2.8. 抗体と抗体医薬

抗体医薬品とは、特定の細胞や組織(物質や分子)にだけ効果がある抗体を利用した医薬品のことである。抗体医薬品は、がん細胞などの表面に出ている抗原タンパク質をピンポイントでねらい撃ちするため、治療効果と副作用の軽減が期待できる。そのため、効果的かつ副作用の少ないがん治療が可能になることが期待されている。現在、抗体医薬品では、モノクローナル抗体が注目されている。モノクローナル抗体の医薬品は、従来の医薬品に比べ、薬剤の標的がはっきりし、しかも副作用が少なく治療効果がより期待できる。さらに、遺伝子工学的な手法による改変、改良が可能であり、組み換え体の製造技術の確立できれば、工業生産が可能になる。

2.9. 細胞内ドメインの配向性変化

サイトカインレセプターのEpoR膜貫通ドメインと細胞内ドメインN末端の十数残基は α -Helix構造になっていることが提唱されている(6)。サイトカインレセプターの活性化は細胞内ドメインの配向性変化にかかわっていると考えられる。EpoRの膜貫通ドメインと細胞内ドメイン間にアミノ酸残基を入れることにより細胞内ドメインの配向性が変われると考えられる。2001年にS. N. ConstantinescuらはEpoR膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間の α -Helix中にAla残基を1～4個入れ、それにより細胞内ドメインの配向性を変化させることができるという論文を発表した(6)。結果はFig.2-8に示した。計算化学により、入れるAla残基1個ごとに細胞内ドメインの角度変化は110度という結果が予想されたが、実際の細胞増殖活性も角度変化に対応する

変化が見られた. このように細胞内ドメインの配向性変化は受容体のシグナル伝達に大きな影響を及ぼすことが示唆された.

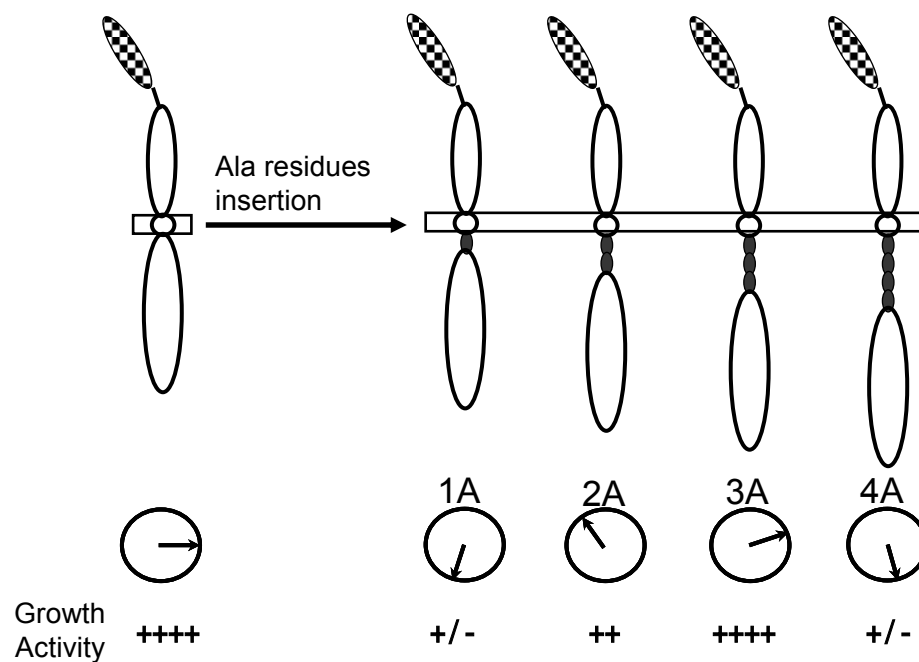


Fig. 2-8 EpoR 膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間への Ala 残基の挿入による細胞内ドメインコンホメーション変化

3. 実験材料

3.1. Ba/F3 細胞

Ba/F3 (48)細胞はマウスの骨髄由来の IL-3 依存性 pro-B 細胞株である。IL-3R を内在的に発現しており IL-3 を培養上清から除去すると速やかにアポトーシスを起こして死滅する。また、未分化なため内在性のサイトカインレセプターをほとんど持たない。さらに目的とするサイトカインレセプターを遺伝子導入で発現させるとそのサイトカインにตอบสนองようになる。以上よりこの細胞はサイトカインのシグナル伝達の研究に多く用いられてきた。

3.2 Plat-E 細胞 & pMX Vector

3.2.1. Plat-E 細胞(49)

Plat-E 細胞はパッケージング細胞である。パッケージング細胞はレトロウイルスの構造タンパク質(gag, pol および env)を産生する細胞である(50)。パッケージング細胞にレトロウイルスベクターを導入すると、パッケージングシグナル Ψ を有するレトロウイルスベクターはウイルス粒子に取り込まれ、感染可能な粒子となる(51)。

Plat-E 細胞は、293T 細胞株をもとにして作られたレトロウイルスパッケージング細胞であり、パッケージングコンストラクトのプロモータとしてプロモータ活性の強い EF-1 α を使い、gag-pol あるいは env 遺伝子の発現にバイシストロニックベクターを利用して発現した。これらのコンストラクトでは EMCV(encephalomyocarditis virus)(52, 53)由来の IRES(internal ribosomal entry site)(54)配列の前にウイルスの構造遺伝子、後ろに薬剤耐性遺伝子を配した。IRES を使うことにより、薬剤選択下でのウイルス構造遺伝子の発現が保証される。さらに、gag-pol, env の遺伝子はコーディング領域のみを使用し、翻訳効率を高めるために開始コドン ATG の上流にはコザック配列として GCC GCC ACC を付加した。これらのパッケージングコンストラクトを導入して作成された Plat-E 細胞は、高い力価のウイルス(1×10^7 /ml)を安定して産生する。

3.2.2. レトロウイルスベクターの pMX Vector(50)

レトロウイルスベクターは、ウイルスの本来の構造遺伝子を除いて、その部分に目的の遺伝子や薬剤選択遺伝子を組み込めるようにしたものである。基本的な構造は、2つの LTR(long terminal repeat)とパッケージングシグナル Ψ である。レトロウイルスベクターは、レトロウイルスの構造遺伝子をもたない欠損型(replication-defective)であるため、ウイルス粒子を作るには、ウイルスの構造タンパク質を供給する細胞(パッケージング細胞)が必要になる。現在レトロウイルスベクターとして利用されているものはマウス白血病ウイルス MuLV 由来のものが中心である。pMX ベクターは、薬剤耐性遺伝子など余分な部分を極力排除し、cDNA ライブラリー作成用のマルチクローニングサイトを挿入したもので、ベクターサイズが小さいこともあり、感染効率、発現効率がよい。

3.3. COS-1 細胞

1964 年当時、ラウス肉腫ウイルス (RSV) の感染によって、霊長類で腫瘍が形成されることが知られていた。そこでジェンセンたちは、正常なサルの細胞に RSV を感染させ、CV-1 細胞はその研究のために African Green Monkey の腎臓の細胞から樹立された細胞株である(55)。

CV-1 細胞にサルを宿主とするポリオーマウイルス SV40 の変異株を感染させて形質転換することで、変異型ウイルスの増殖に使える宿主細胞 COS 細胞が作出された(56)。外来遺伝子の発現効率が良いので、タンパク質を一過的に発現させる場合に良く用いられる。得られた COS 株には COS-1, COS-3, COS-7 の 3 種類があり、中でも COS-7 は研究材料としてよく使われてきた。

3.4. IL-3 (Interleukin-3) と IL-3 レセプター

IL-3 (別名 Multi-CSF) は分子量 14-28KDa, T 細胞, 肥満細胞から産生されるインターロイキンである。細胞分化を調整し、様々な造血性前駆細胞, 肥満細胞, 好塩基球, NK 細胞などの増殖を促進できる(57)。

ヒト IL-3 レセプターは IL-3 に特異的な α 鎖(CD123)(58, 59)と, IL-5, GM-CSF と共通する β 鎖(β c 鎖: CD131)(60)から構築される。 α 鎖, β c 鎖ともにサイトカインレセプターファミリーのクラス 1 タイプに属する。 α 鎖は単独で低親和性の結合能を有するが β c 鎖単独では IL-3 への結合能はなく, α 鎖と β c 鎖で高親和性レセプターを構築する。一方, マウスでは β 鎖が 2 種類存在し, 1 つは IL-5, GM-CSF と共通な β c 鎖で, IL-3 に対して明らかな結合能はもたない。もう 1 つは IL-3 に対して低親和性結合能を持つ β IL-3 鎖である。 β c 鎖と β IL-3 鎖はアミノ酸レベルで 92% のホモロジーがあり, IL-3 に関する機能は遺伝子再構成実験レベルでは同等である。

3.5. Epo (Erythropoietin), EpoR 及び EpoR によるシグナル伝達

Epo (エリスロポエチン) は, 腎臓の尿細管間質細胞で産生され, 赤血球を増やすホルモンである。エリスロポエチンの産生は, 血液中の酸素分圧によって調節されている。体が酸素不足状態になると, 低酸素応答性の転写因子である HIF (hypoxia inducible factors) が誘導される, HIF は酸素濃度が高いときには分解され, 低酸素のときには核内に移行してエリスロポエチンの転写を促進する(61-63)。エリスロポエチンは赤血球上のエリスロポエチンレセプター(EpoR)に結合し, JAK2 カスケードを活性化する。この EpoR は多くの骨髄細胞, 白血球, 末梢・中枢神経に発現しており, Epo に結合することで細胞内のシグナル伝達に関わっている。

EpoR は, 赤血球前駆細胞表面に存在する。Epo と EpoR の結合により, 細胞内に赤血球分化, 増殖, アポトーシス抑制のシグナルが伝達され, 成体内の赤血球数が増加する(64)。EpoR は, 構造的にも機能の特征的にもインターロイキン, ヒト成長ホルモン (hGH), コロニー刺激因子を含む I 型サイトカインレセプタースーパーファミリーに属する。生存, 増殖, 分化の主な標的細胞は後期赤芽球前駆細胞 (CFU-E) であり, これが最も多くの

EpoR を持つ。細胞外ドメインによく保存された領域（WSXWS モチーフおよび四つのシステイン残基）を持ち、細胞内ドメインの膜付近に BOX1, BOX2 と呼ばれる各種サイトカインレセプター間によく保存されている配列が存在する(65)。

EpoR はリガンド非結合時でも不活性ではあるがダイマー化している（pre dimer）(66)。このプレダイマーの状態では、EpoR は細胞外ドメインが相互作用している状態と、膜貫通ドメインが相互作用している状態が平衡状態で存在し、細胞外ドメイン D2 ドメインの C 末端間の距離が長くて 73 Å もあるから、細胞内ドメインにある Jak2 キナーゼが、互いにリン酸化できない。しかし、Epo が結合することにより膜貫通ドメインが相互作用するコンホメーション変化が起こって、D2 ドメインの C 末端間の距離は 39 Å になる、この細胞内ドメインのコンホメーション変化により、JAK2 チロシンキナーゼが活性化し、受容体自身およびそれに結合してくる転写因子 STAT5 がリン酸化され、二量体を形成し、核に移行して標的遺伝子のプロモーター部に結合して転写を調節する(67, 68)。具体的な機構は Fig. 3-1 に示した。

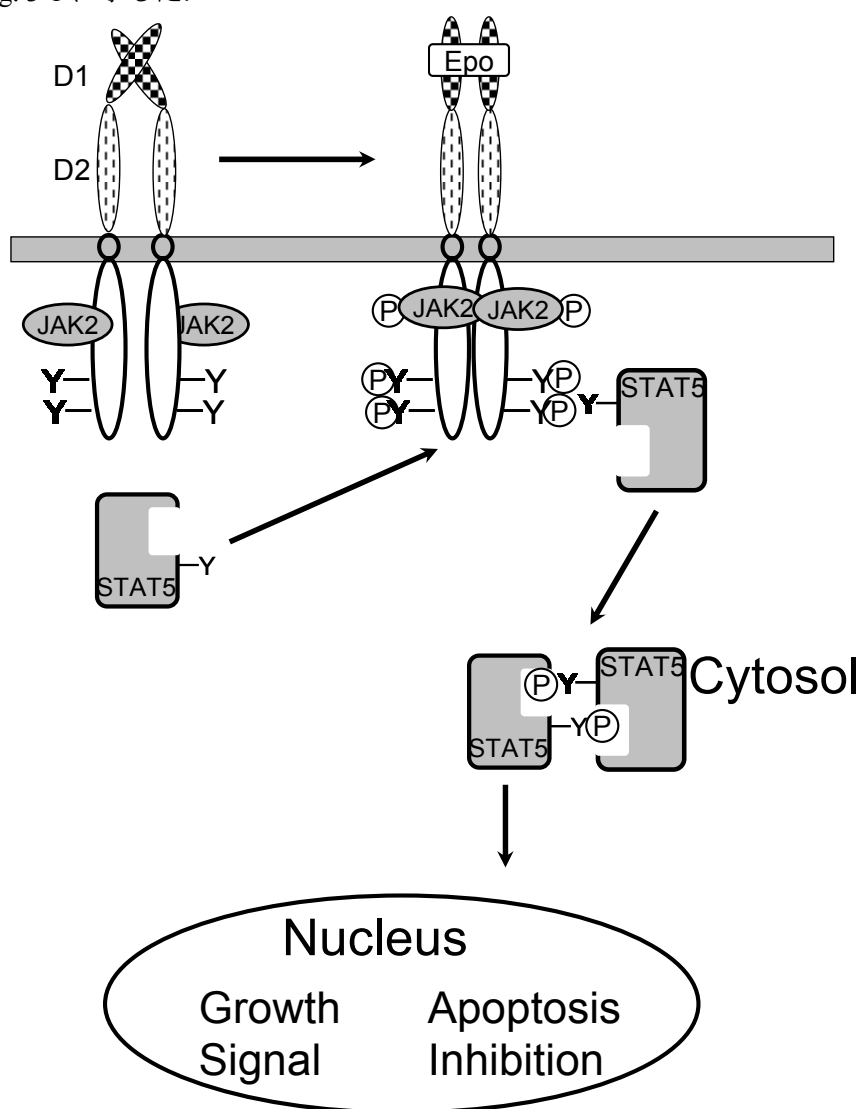


Fig. 3-1 EpoR によるシグナル伝達機構

3.6. gp130 及び gp130 によるシグナル伝達

gp130 は、細胞外ドメインに保存された領域 (WSXWS モチーフおよびシステイン残基) を持ち、I 型サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する。gp130 は interleukin-6(IL-6), interleukin-11(IL-11), leukemia inhibitory factor(LIF), ciliary neurotrophic factor(CNTF), oncostatinM(OSM), cardiotrophin-1(CT-1)などの IL-6 タイプサイトカインで共有されるシグナル伝達機能を担う受容体である(69)。IL-6 と IL-11 は gp130 ホモ二量体, LIF や CNTF, OSM, CT-1 は gp130 と LIFR あるいは OSMR とのヘテロ二量体を経由して、T 細胞・B 細胞等の免疫細胞、造血細胞、肝細胞、神経細胞に対して、増殖・分化・細胞死の制御など、多種多様なシグナルを細胞内に伝えることが知られている。

gp130 を介するシグナル伝達は、IL-6 のシグナル伝達を中心に解析されてきた(69-72)。IL-6 は、細胞膜上に存在する IL-6 受容体 α と結合する。さらに、IL-6 受容体 α は、gp130 と会合するとともに gp130 どうしの二量体(homodimer)形成を誘導する。gp130 の細胞内領域には、I 型サイトカイン受容体スーパーファミリー間で保存された、領域 Box1, Box2 構造が存在し、この部分にチロシンキナーゼ JAK ファミリーに属する JAK1, JAK2, TYK2 が構造的に会合することが明らかとなっている。刺激により、gp130 が二量体を形成するとともに、gp130 に会合する JAK も相互接近し、JAK どうしをチロシンリン酸化することにより活性化するものと考えられている。さらに、活性化された JAK は、JAK をリン酸化するだけでなく、gp130 細胞内領域に存在するチロシン残基および、種々のシグナル伝達分子をリン酸化し、活性化することが知られている。これらシグナル伝達分子の内、転写因子 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3)は、分子内に、特異的リン酸化チロシン構造を認識する SH2 (src homology 2)ドメインを有し、gp130 細胞内領域リン酸化チロシンを特異的に認識し、gp130 上に運ばれてくると考えられ、JAK によりチロシンリン酸化される。チロシンリン酸化された STAT3 は、自身の SH2 ドメインを介して STAT3 二量体(homodimer)あるいは STAT1 との二量体(heterodimer)を形成し、核内へ移行し、特異的 DNA 配列を認識して結合し、多くの遺伝子の転写を制御していることが知られている (Fig. 3-2)(69)。

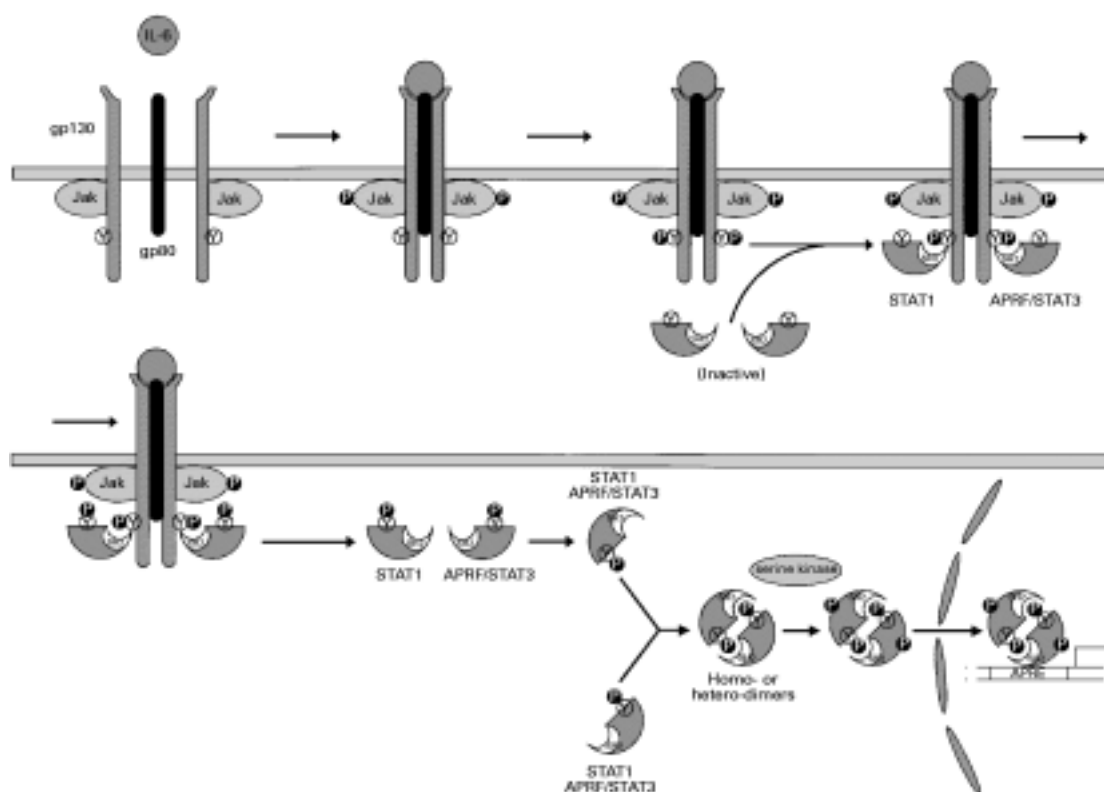


Fig. 3-2 gp130 によるシグナル伝達機構

3.7. FL と 抗 FL 抗体 31IJ3 Clone ScFv

FL は 1871 年、アドルフ・フォン・バイヤー (Adolf von Baeyer) により発見された(73). 1905 年に「有機染料およびヒドロ芳香族化合物の研究」によってノーベル化学賞を受賞した. Fig. 3-3 に示したように, $C_{20}H_{12}O_5$, 分子量 332.31 の蛍光性色素である. アルカリ塩は水に溶け強い蛍光を発する. イソチオシアネート誘導体 (FITC : fluorescein isothiocyanate) は弱アルカリ性の条件下でタンパク質, ペプチドの遊離のアミノ基と反応してチオウレイド結合する. 色素自体が安定で標識タンパク質の変性も少ないので抗体の蛍光標識として最もよく用いられている(74). また抗原決定基を 1 ないし 2 個しか持たないため, 抗体との結合能は持つが単独では免疫応答を誘導する能力を持たない低分子化合物のハプテン抗原である(75).

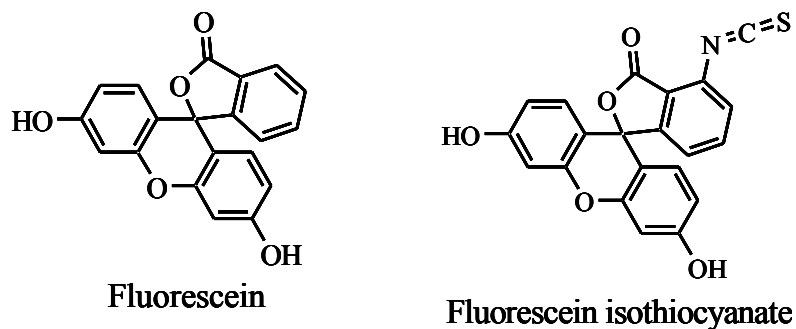


Fig. 3-3 Fluorescein and fluorescein isothiocyanate

抗フルオレセイン抗体はヒト型ファージライブラリーからパニングによって選択され、立体構造などもよく分析された(76, 77). 本研究に使った抗 FL 抗体遺伝子 31IJ3 Clone は MRC(the medical research council (Cambridge University))の Tomlinson 博士から頂いたものである.

3.8. IRES(54)

ピコornaウィルスの 5'非翻訳領域に存在する配列であり、リボソームがこの領域に結合する. そのため、1つの mRNA から2つ以上の蛋白質を発現させることはできる、マーカーの違う2種類のベクターを遺伝子導入するかわりに IRES の配列を利用することで2つの目的遺伝子を1つのベクターに連結して遺伝子導入することができる.

3.9. 緑色蛍光タンパク質 EGFP (enhanced green fluorescent protein)

GFP はオワンクラゲ(*Aequorea*, または通称 *Aequorea victoria*, *Aequorea forskalea*)がもつ分子量約 27 kDa の蛍光蛋白質である. 1960 年代に下村脩博士によってイクオリンとともに発見、分離精製された(78). 下村博士はこの発見で、2008 年にノーベル化学賞を受賞した. オワンクラゲの生体内ではイクオリンと複合体を形成している. 細胞内カルシウムを感知して発光するイクオリンは、単体では最大蛍光波長 460 nm の青色であるが、オワンクラゲの発色細胞内では、GFP がイクオリンから励起エネルギーを受け、最大蛍光波長 508 nm の緑色の蛍光を発する (フォルスター型エネルギー転移). GFP の緑色蛍光の発色に関しては、下村博士の一連の研究により提唱された発色団の分子構造モデルをもとに、10 数年を経て 1990 年代になって発色団の分子構造が確認された. GFP 分子内での発色団の形成には自己脱水結合のみで充分であり、酵素など他分子の助けを必要としない. 1990 年代、ワード (Ward) ・プレーシャー (Prasher) らのグループが GFP 遺伝子の同定・クローニングに成功(79), チャルフィー(Chalfie, M), チェン(Tsien, R.Y.)らのグループがトランスジーンとして異種細胞への GFP 導入・発現に成功した(80-82). チャルフィーおよびチェンもまた、下村と同時にノーベル化学賞を受賞している. GFP の発色は基質を必要としないことや単体で機能するなどの特徴から、また、発色団形成に酵素反応が必要でないこと、異種細胞への発現方法が確立したことなどから 1990 年代にレポーター遺伝子として広く普及した(83, 84).

3.10. 既往の抗体-受容体キメラ

既往の研究で構築された抗体-受容体キメラは Fig.3-4 に示してある. NoHA-SD2c 抗体-受容体キメラ(私が構築した抗体-受容体キメラの N 末端には検出のために全部 HA-tag を付加したため、それと区別するために、以前に構築された HA-tag が付加されていない抗体-受容体キメラの名前の前に NoHA をつけた)はワイルドタイプの EpoR にある細胞外ドメインの D1 を抗 FL 抗体 ScFv (31IJ3 clone)で置換したものである. NoHA-SD2em は NoHA-SD2c 抗体-受容体キメラの膜貫通ドメインのロイシンジッパー様構造中に相互作用を弱める Mutation を導入したものである. NoHA-SD2g は NoHA-SD2c 抗体-受容体キメ

ラの細胞内ドメインを EpoR 細胞内ドメインから gp130 細胞内ドメインで置換したものである, 同じように NoHA-SD2gm は NoHA-SD2m の細胞内ドメインを gp130 で置換したものである.

それぞれの抗体-受容体キメラを IL-3 依存性 BaF3 細胞に導入して, 抗体-受容体キメラのリガンド濃度依存性を評価した結果, NoHA-SD2e, NoHA-SD2em 抗体-受容体キメラを発現した細胞は BSA-FL のありなしに関わらず, 増殖する結果が得られた. 一方, NoHA-SD2g, NoHA-SD2gm 抗体-受容体キメラを発現した細胞では BSA-FL のありなしに関係せずに増殖が見られなかった.

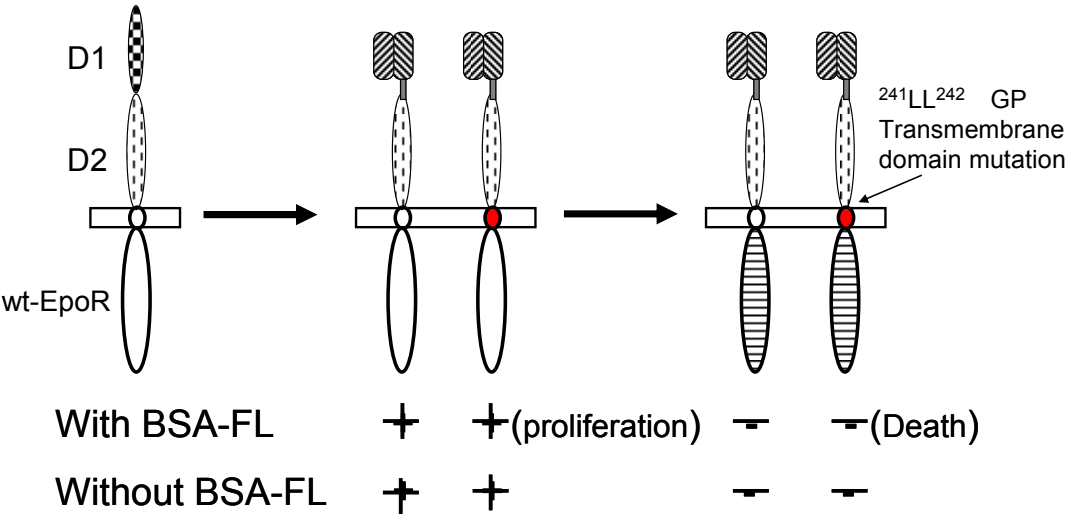


Fig. 3-4 既往に構築した抗体-受容体キメラ. 左から右へ NoHA-SD2e, NoHA-SD2em NoHA-SD2g, NoHA-SD2gm 抗体-受容体キメラである

3.11. hSOD1

hSOD1 (スーパーオキシドジスムターゼ) の構造は Fig.3-5 に示した. アミノ酸残基数 : 308 分子量 : 31973.4Da(85, 86). フリーラジカルは生物学的に重要な分子や細胞構造に深刻なダメージを与える. フリーラジカル原子の最外殻にはペアをつくっていない電子があり, この電子は化学的に不安定で, 安定な電子殻をつくるために他の分子と反応しようとする. 生物学的に重要なフリーラジカルの多くは活性酸素と呼ばれる酸素原子を含んでいる. フリーラジカルはほとんどの場合体に有害であると考えられているが, 有用に使われることもある. しかしながら, 過剰量のフリーラジカルの発生は好ましいものではない. ビタミン C のような抗酸化剤がフリーラジカルに結合することでこれに対抗しているビタミン C に代表されるような種々の小分子に加えて, 体にはフリーラジカルに対抗するための 2 種類の蛋白質がある. 一つはスーパーオキシドジスムターゼでもう一つはカタラーゼである. スーパーオキシドとは過剰な電子を持った 2 原子酸素のことである. スーパーオキシドジスムターゼはこのスーパーオキシドを通常の酸素と過酸化水素に変換する. できた過酸化水素はカタラーゼによってさらに水と酸素分子とに分けられる. ここで見るスーパーオキシドジスムターゼは二量体の分子である. この分子に欠損があることによ

り致死性の病気にもつながる(87-89). その一つが ALS であり, この病気は Lou Gehrig 病としてよく知られている. この病気にかかると体が麻痺してしまい, 5 年間以内に死に至る. この病気が起こる仕組みを解明するためにこの酵素の構造が解かれた. 酵素反応には 2 つの金属イオンが関わっており, 2 つの単量体の片方には銅, もう一方には亜鉛が含まれている. 金属イオンと蛋白質との相互作用部位は, 亜鉛イオンと相互作用する 1 残基のアスパラギン酸側鎖以外はすべてヒスチジン側鎖の窒素原子とのものである. 病気の原因となる変異の位置が決定されると, それらはすべて酵素の活性部位に関連した領域ではなかった.

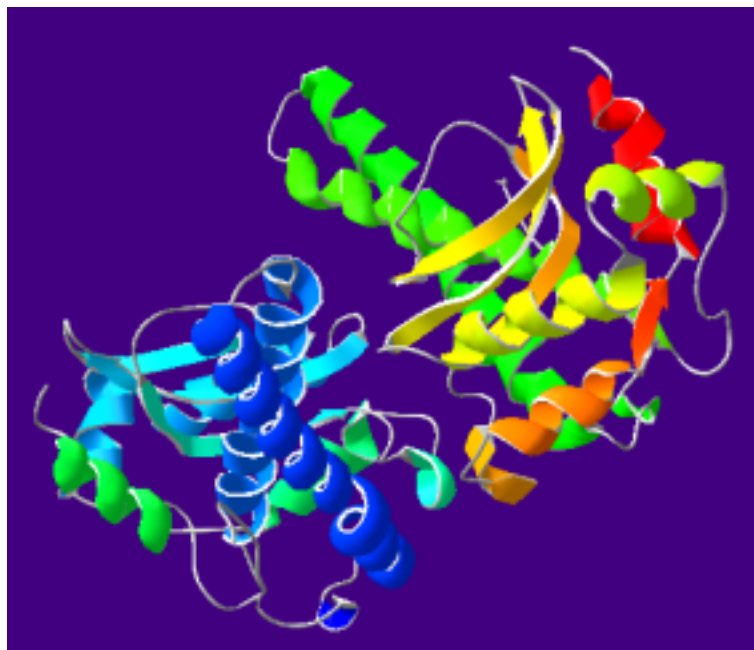


Fig. 3-5 SOD の立体構造図

まだ現在の変異による病態誘発メカニズムは解明されていないが, おそらく, 変異蛋白質が不安定になり, したがって, 欠損スーパーオキシドジスムターゼは完全に役に立たなくなっているわけではなく, 酵素としての活性の効率が落ちていると予想されている(90, 91).

3.12. ScFv Tomlinson I/J Library

ScFv Tomlinson Library は V_H (V3-23/DP-47 and JH4b) and V_k (O12/O2/DPK9 and Jk1) に抗原結合残基と考えられたアミノ酸残基を PCR 法でライブラリー化した ScFv Library である. 抗原結合アミノ酸残基は 18 残基 H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 and L96 である. ScFv Tomlinson J Library は NNK プライマーで PCR したライブラリー, Library size : 1.37×10^8 . 一方, DVT プライマーで PCR したのは ScFv Tomlinson I Library である, Library size : 1.47×10^8 である. ScFv 断片が pIT2 (HIS myc tag) ベクターに組み込まれている. ScFv の N 末端に *SfiI* サイトがあり, C 末端に *NotI* サイトがある. 今回の実験に使った ScFv Tomlinson Library は MRC から購入したものであ

る.

3.13. Anti-hSOD1 Antibody Library

共同研究先である兵庫医科大学の藤原先生らのグループにより作製された Anti-hSOD1 Antibody Library を使った. マウスに hSOD1 を使って三回免疫を行った. 免疫の行ったマウスの脾臓細胞から Total RNA を抽出した. RT-PCR により抗体 V_H 鎖, V_L 鎖または両方を連結した ScFv 部分を増幅して, Anti-hSOD1 V_H Library, Anti-hSOD1 V_L Library と Anti-hSOD1 ScFv Library を作製した.

4. 抗体-EpoR キメラの EpoR ドメインのシグナル伝達に対する影響

4.1. 序論

EpoR は、赤血球前駆細胞表面に存在するサイトカイン受容体であり、Epo と EpoR の結合により、細胞内に赤血球細胞分化、増殖、アポトーシス抑制のシグナルが伝達され、成体内の赤血球数が増加する(64, 65, 92). 近年、EpoR のガン細胞表面での発現についての報告は多くあり(93-96), EpoR をターゲットにした治療も注目された(97-100).

EpoR 細胞外 D1 ドメインはリガンドなしの時にも鎌状の形をしたダイマーになっている(66). そこに Epo が結合することにより EpoR にはコンホメーション変化が起こり、EpoR 細胞内ドメインに結合している JAK2 を活性化する(67, 101). 活性化された JAK2 はレセプター細胞内ドメインにある 8 つのチロシンをリン酸化する. Src-homology (SH2)ドメインのあるシグナル伝達経路に関わる蛋白質がそのリン酸化されたチロシンのところに結合してからシグナル伝達を開始される.

今まで EpoR の膜貫通ドメインと細胞内ドメインに関する研究はいろいろ行われていた. EpoR 膜貫通ドメインはダイマー化に強く寄与していることが分かった(102-105). EpoR 細胞外ドメインの機能について、Epo の代わりに Epo-mimetic peptides (EMP)が合成され、EpoR 細胞外ドメインと結合することによりシグナル伝達する報告があった(106, 107). 二つの EMP 系合成ペプチド EMP1 と EMP33 はあり、立体構造においては Main 鎖と Side 鎖の相同性は非常に高かったが、EpoR との結合を X-ray で分析したところ、二つのペプチドと EpoR の結合した時の角度では約 15° という微妙な差があった. そのわずかの差により EMP の性質が大きく変わり、EMP1 がアゴニスト、一方、EMP33 はアンタゴニストとして機能した. EpoR 細胞外ドメインのわずかのコンホメーション変化によりシグナル伝達に大きな影響を与えていることが示唆された. さらに、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間への Ala 残基の挿入により、細胞内ドメインの配向もシグナル伝達に大きな影響を持つことが分かった(6). 彼らの研究では、EpoR 膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基一個を挿入することにより、細胞内ドメインの角度が 109° 回転されると予測した. 実際細胞増殖活性を測定したところ、予測した細胞内ドメインの回転角度が細胞増殖活性に影響を与えた. Greiser らも IL-5/gp130 キメラの膜貫通ドメインと細胞内ドメインに Ala 残基を挿入し、下流シグナル伝達蛋白質である STAT1 と STAT3 のリン酸化状況を調べ、Ala 残基の挿入による影響を考察した(108). しかしながら、EpoR 細胞外ドメイン自身のシグナル伝達に対する影響はまだわかってない. EpoR 細胞外ドメインは X-ray 解析により D1 ドメインと D2 ドメインの二つのサブユニットになり、本研究では N 末端に検出のため HA-tag を付加し、3 種類の EpoR 細胞外ドメイン (D1 ドメインのみ、D2 ドメインのみ、D1 と D2 両方) を持つ抗体-受容体キメラを構築した. 構築した抗体-受容体キメラの HA-tag と EpoR 細胞外ドメインの間に Anti-FL ScFv を融合した. さらにそれらの抗体-受容体キメラをベースにして、細胞内ドメインのコンホメ

ーションを変わるために、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を一つから四つまで挿入した抗体-受容体キメラも構築した。抗原である BSA-FL に対する増殖依存性を Growth Assay で評価した。さらに、構築した抗体-受容体キメラの細胞外ドメインの異なる部位に結合する複数のリガンドを使った刺激実験を行った。FL 修飾 BSA (BSA-FL) と DNA により FL を連結した FL dimer 13 は ScFv 部位と結合する。Epo は細胞外 D1 ドメインの持つ抗体-受容体キメラをダイマー化させることができる。N 末端に HA-tag が付加されているので、Anti-HA 抗体により抗体-受容体キメラをダイマー化させることが可能であり (109), さらに、Anti-IgG 抗体の添加によりオリゴマー化させることができる。それぞれのリガンド刺激により、抗体-受容体キメラのコンホメーション変化を引き起こし、シグナル伝達に対する影響をシグナル伝達経路にある蛋白質 JAK2, STAT5 と ERK1/2 のリン酸化状況を調べることで評価した。

4.2. 実験方法

4.2.1. ベクター構築

EpoR をベースにした抗体-受容体キメラシリーズを構築した。構築した抗体-受容体キメラのドメインは Anti-FL ScFv 31IJ3 clone ; EpoR 細胞外 D1, D2 ドメイン ; EpoR 膜貫通ドメインと細胞内ドメインを含む。分かりやすくするために、構築した抗体-受容体キメラの名前をつけるときに、以下のような略字を使った : S, single chain Fv ; D1, EpoR 細胞外 D1 ドメイン ; D2, EpoR 細胞外 D2 ドメイン ; e, EpoR 細胞内ドメイン ; 数字, 挿入した Ala 残基の数で表す。例えば、抗体-受容体キメラ SD1D2e-2A には ScFv-D1-D2 細胞外ドメインと EpoR 膜貫通および細胞内ドメイン、さらに膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基が二つ挿入された構造になる。本研究で構築した抗体-受容体キメラの N 末端に検出のため、HA-tag がつけられた。それと区別するために、以前に構築された N 末端に HA-tag のついてなかった抗体-受容体キメラの名前の前に NoHA をつけることにした。以前に構築された抗体-受容体キメラは Fig4-1 に示した構造をもち、NoHA-SD2e, NoHA-SD2em, NoHA-SD2g と NoHA-SD2gm と名づけた (m は以前に構築した抗体-受容体キメラの中で膜貫通ドメインに相互作用を弱める Mutation を導入した抗体-受容体キメラである)。抗体-受容体キメラ NoHA-SD2e は ScFv-GSG-D2-TM-e という構造になっており、GSG というアミノ酸のリンカーが ScFv と D2 の間に挿入されている。NoHA-SD2em 抗体-受容体キメラの膜貫通ドメインのロイシンジッパー様構造には、Mutation (LL→GP) を導入した構造を持っている。二つのロイシンジッパー様構造間の相互作用がシグナル伝達に重要である。ロイシンジッパー構造に LL→GP の Mutation を導入することにより、相互作用を弱める効果があると報告された (103)。抗体-受容体キメラシグナル伝達の恒常活性による細胞増殖 Background を減らすことができると考えて構築された抗体-受容体キメラである。

以前に構築した抗体-受容体キメラを用いて抗体-受容体キメラをベクター構築し

た.

1. Fig.4-2, Primer (disp anti: 5'-GGG TCC GGA ACC AGC ATA ATC TGG AAC ATC-3', disp sense: 5'-GGG GAA TTC ACC ATG GAG ACA GAC ACA-3')によりpDisplay VectorからHA-tag部分を増幅させた, *Bsp*EIと *Eco*RIで処理した後, 同じ制限酵素で処理したNoHA-SD2eに組み込ませてD2eベクターを構築した.
2. Fig. 4-3, Primer (ScFv *Age*I Forward: 5'-GGG ACCGGT CAG GTC CAA CTG CAG GAG TC-3', ScFv *Bsp*EI Reverse: 5'-GGG TCCGGA ACC TTT GAT TTC CAC CTT GGT C-3') によりベクターpMK-SE-IGからScFv部分を増幅させた, *Bsp*EIと *Age*Iで処理した後, ベクターとして*Bsp*EIを使ってD2eを処理して, calf-intestine alkaline phosphatase (CIAP)処理して, ScFv部分を組み込ませてSD2eベクターを構築した.
3. Fig. 4-4 Primer (hEpoR D1 sense: 5'- GGG GGTACC TCC GGA GCG CCC CCG CCT AAC CTC -3', hEpoR D2 anti: 5'- GGG GAATTC GAT ATC GGG GTC CAG GTC GCT AGG -3') によりhuman EpoR発現ベクターよりEpoR細胞外D1D2ドメインを増幅させた. *Eco*RIと *Kpn*Iで処理した後, 同じ制限酵素で処理したpBS1 (pBluescriptII SK- (Stratagene, La Jolla, CA)) に組み込ませてベクターpBS2 (pBS-D1D2) を構築した. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を使ってD1ドメイン中にある*Eco*RVサイトを潰した. 使ったPrimerは(d1 RVdel QC sense: 5'-CGG CGC TCC GCG GTA TCA CCG TGTC-3', D1 RVdel QC anti: 5'-GAC ACG GTG ATA CCG CGG AGC GCCG-3')であった. pBS2はテンプレートとして使われた. D1ドメインにある*Eco*RVサイトの潰されたpBS-D1D2ベクターをpBS3と名づけた.
4. Fig. 4-5 pBS3を*Kpn*Iと *Eco*RVで処理した後, 同じ制限酵素で処理したpBSTMベクター(110)に組み込ませてpBS4ベクターを構築した. pBS4を*Bsp*EIと *Bsi*WIで処理した後, 同じ制限酵素で処理したSD2eに組み込ませてSD1D2eベクターを構築した.
5. Fig. 4-6, D2eベクターから*Bsp*EIと*Eco*RIの処理によりHA-tag部分が切り出し, 同じ制限酵素で処理したSD1D2eに組み込ませてD1D2eベクターを構築した.
6. Fig. 4-7, SD1D2eベクターをテンプレートにして, Primer (3rdD1 For: 5'- GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG GC-3', 3rdD1 Rev: 5'-GGG GATATC TAC TTC ATT GAT GTGG-3') によりD1ドメイン断片だけを増幅し, *Bsp*EI と*Eco*RVの処理によりD1ドメイン部分を切り出し, 同じ制限酵素で処理したpBS4ベクターに組み込ませてpBS4-D1TMベクターを構築した. pBS4-D1TMベクターを*Bsp*EIと*Bsi*WIの処理によりD1-TMドメイン部分を切り出し, 同じ制限酵素で処理したD2eまたはSD2eに組み込ませてD1eまたはSD1eベクターを構築した.
7. Fig. 4-8, SD1D2eベクターをテンプレートにして, Primer (Scyt For: 5'- GGG TCCGGA CTC ATC CTG ACG CTC TCCC-3', Scyt Rev: 5'- CGT TAG GGG GGG GGG AGG GAG AGG GGC GGATCC ATCG-3') によりTM内側に*Bsp*EIサイトを作って, *Bsp*EIと*Bam*HIの処理によりEpoR細胞内ドメインを切り出し, 同じ制限酵素

で処理したSD1D2eに組み込ませてSeベクターを構築した.

8. Fig. 4-9~11, SD1D2eベクターをテンプレートにして, Primer (KiTM 1A For: 5'-GGG CGTACG GCT TCC CAC CGC CGG GCT CTG -3', KiTM 2A For: 5'- GGG CGTACG GCT GCC TCC CAC CGC CGG GCT CTG -3', KiTM 3A For: 5'- GGG CGTACG GCT GCC GCA TCC CAC CGC CGG GCT CTG -3', KiTM 4A For: 5'- GGG CGTACG GCT GCC GCA GCG TCC CAC CGC CGG GCT CTG -3' and KiTM A Rev: 5'- CGT TAG GGG GGG GGG AGG GAG AGG GGC GGATCC ATCG -3') により, 膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間にAla残基を一つから四つまで挿入した. 増幅させた断片を*Bsi*WIと*Bam*HIの処理により切り出し, 同じ制限酵素で処理したSD1D2e (SD2e; SD1e)に組み込ませてSD1D2e-1A ~ SD1D2e-4A (SD2e-1A ~ SD2e-4A; SD1e-1A ~ SD1e-4A)ベクターを構築した.

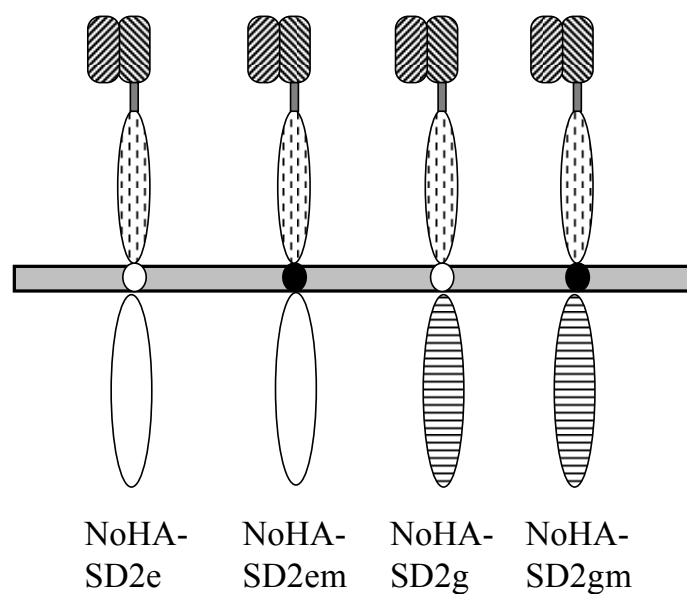


Fig. 4-1 以前に構築された抗体-受容体キメラ

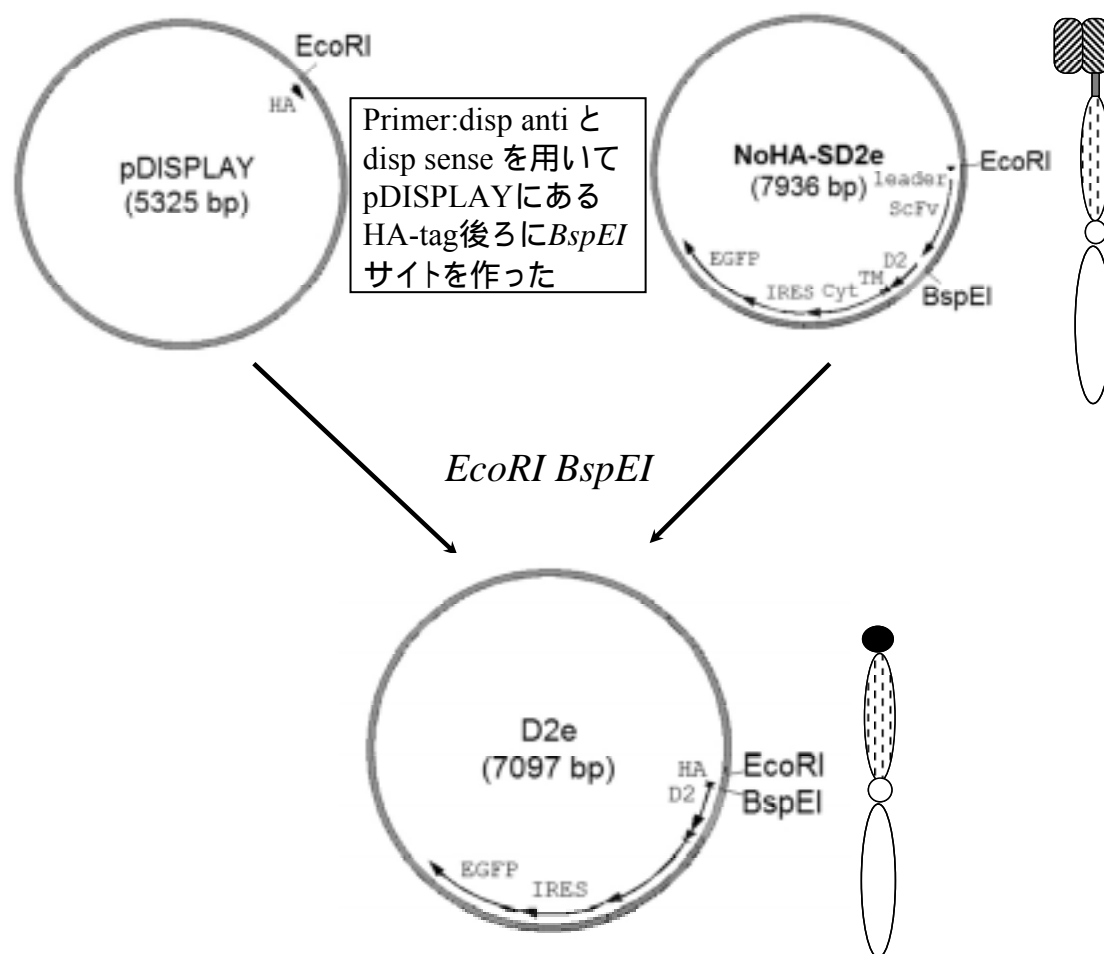


Fig. 4-2 抗体-受容体キメラ D2e の構築

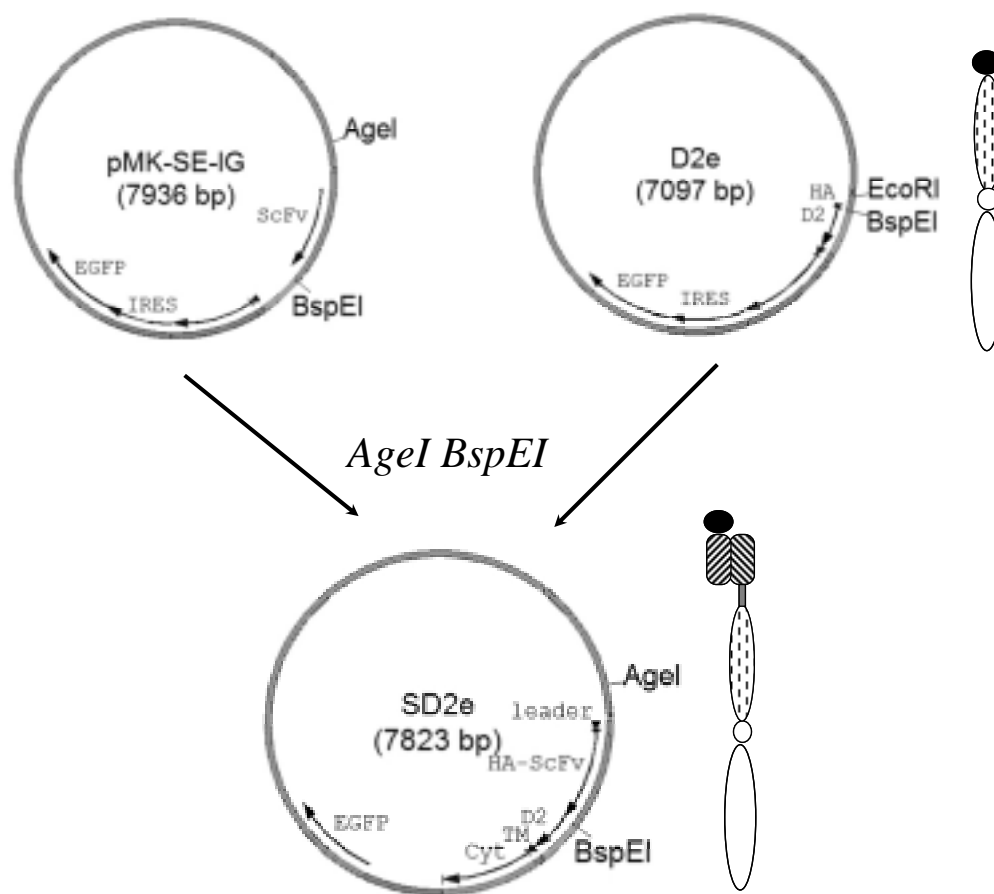


Fig. 4-3 抗体-受容体キメラ SD2e の構築

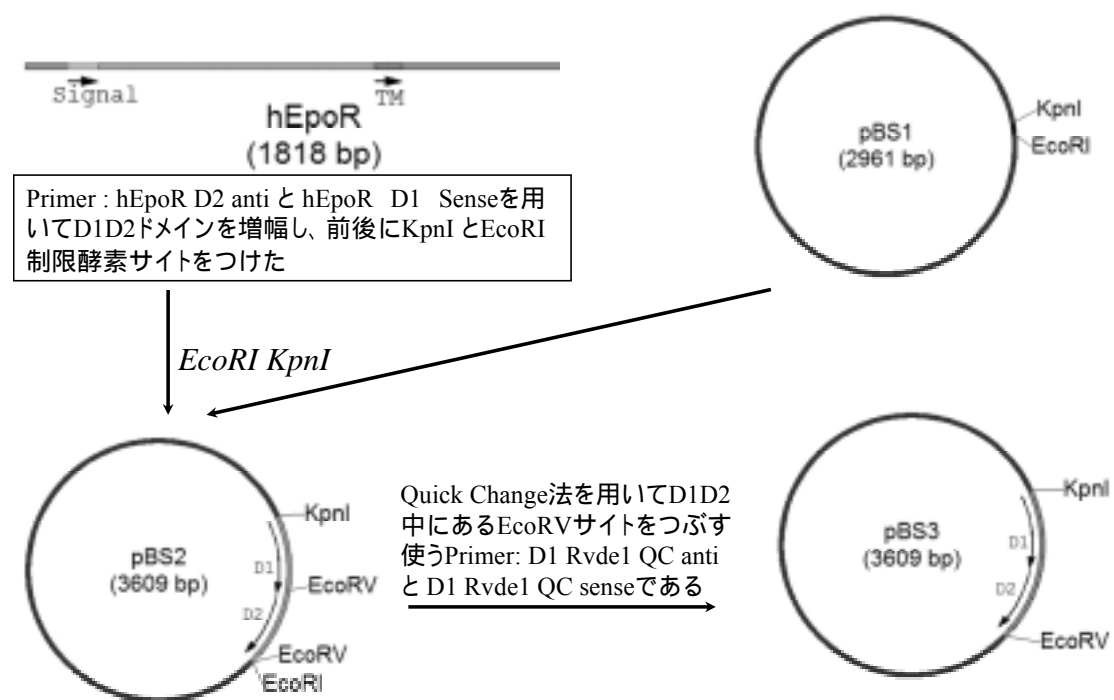


Fig. 4-4 EpoR 細胞外ドメイン D1D2 にある制限酵素サイトの処理

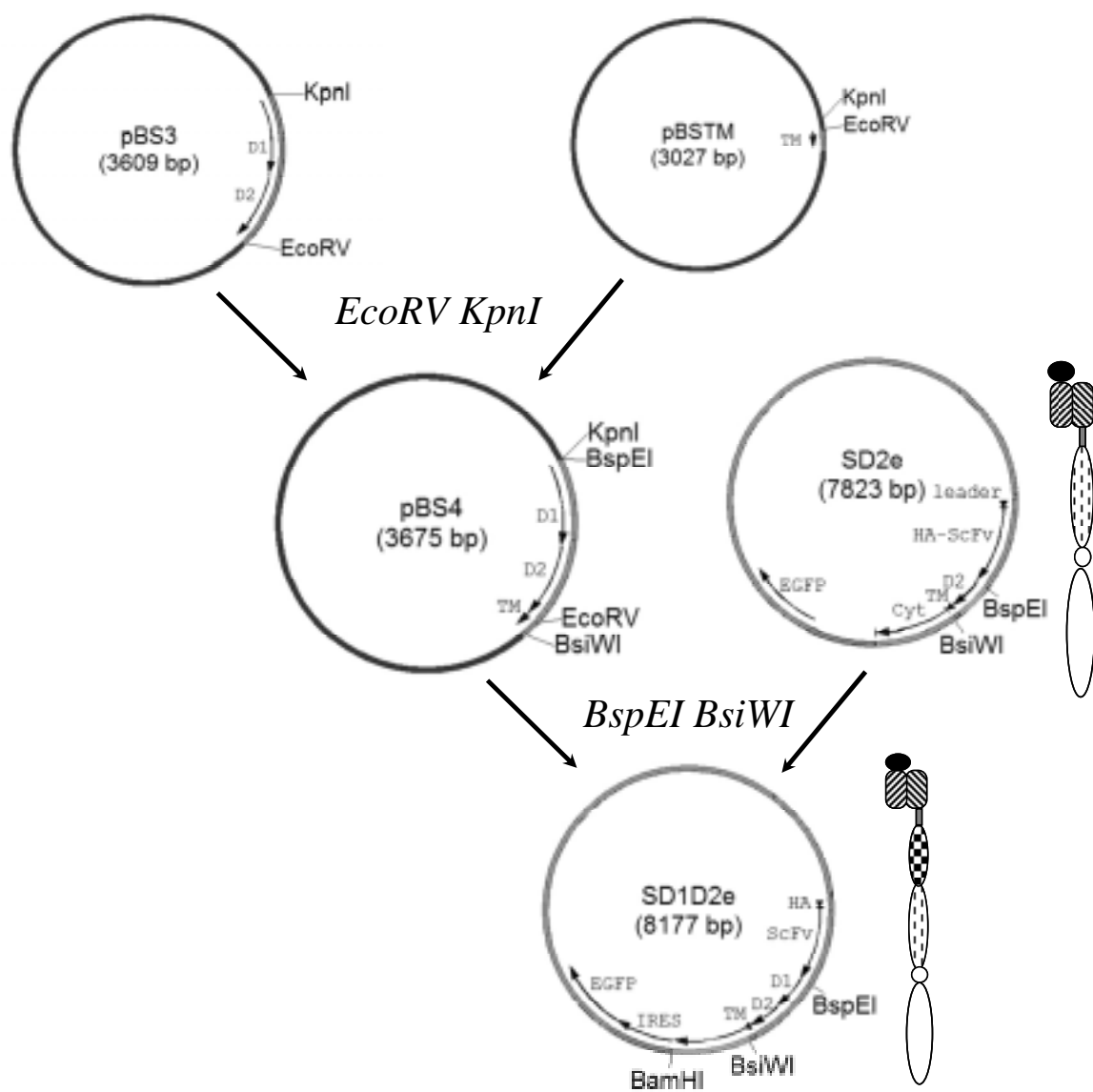


Fig. 4-5 抗体-受容体キメラ SD1D2e の構築

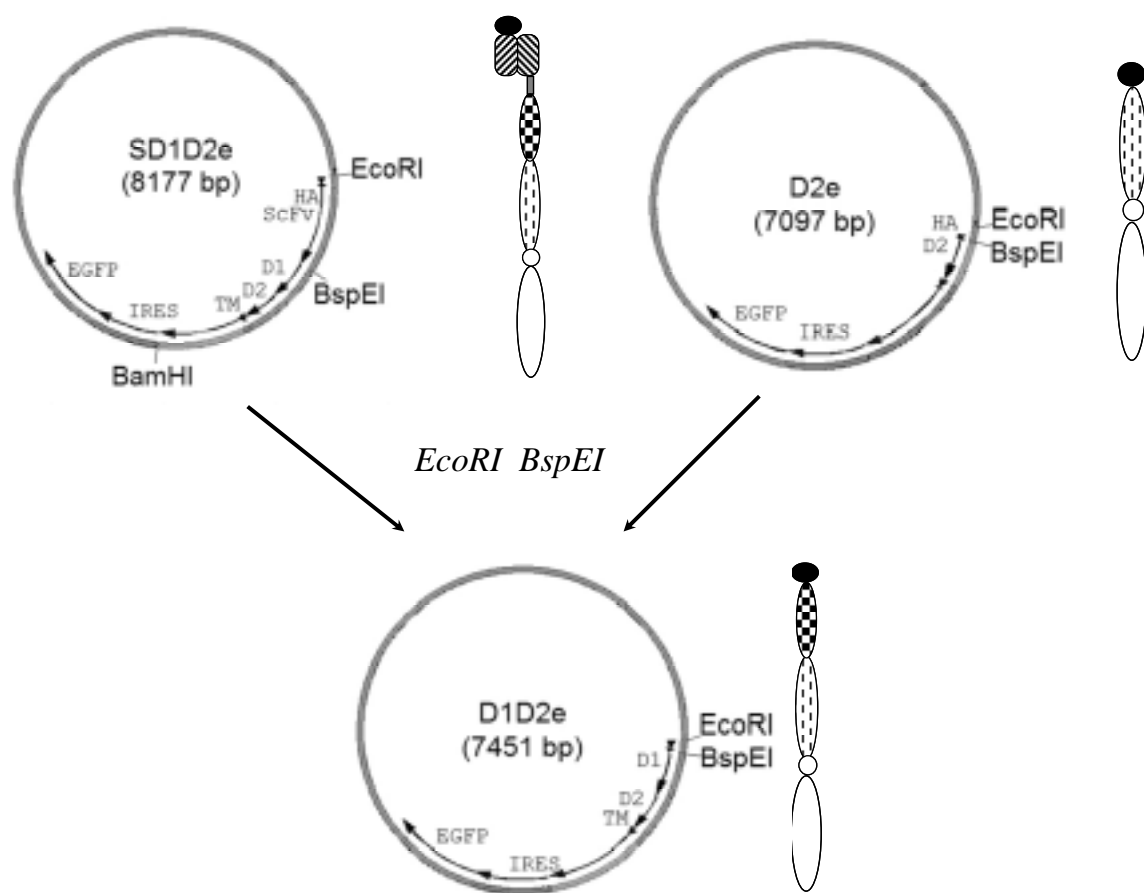


Fig. 4-6 抗体-受容体キメラ D1D2e の構築

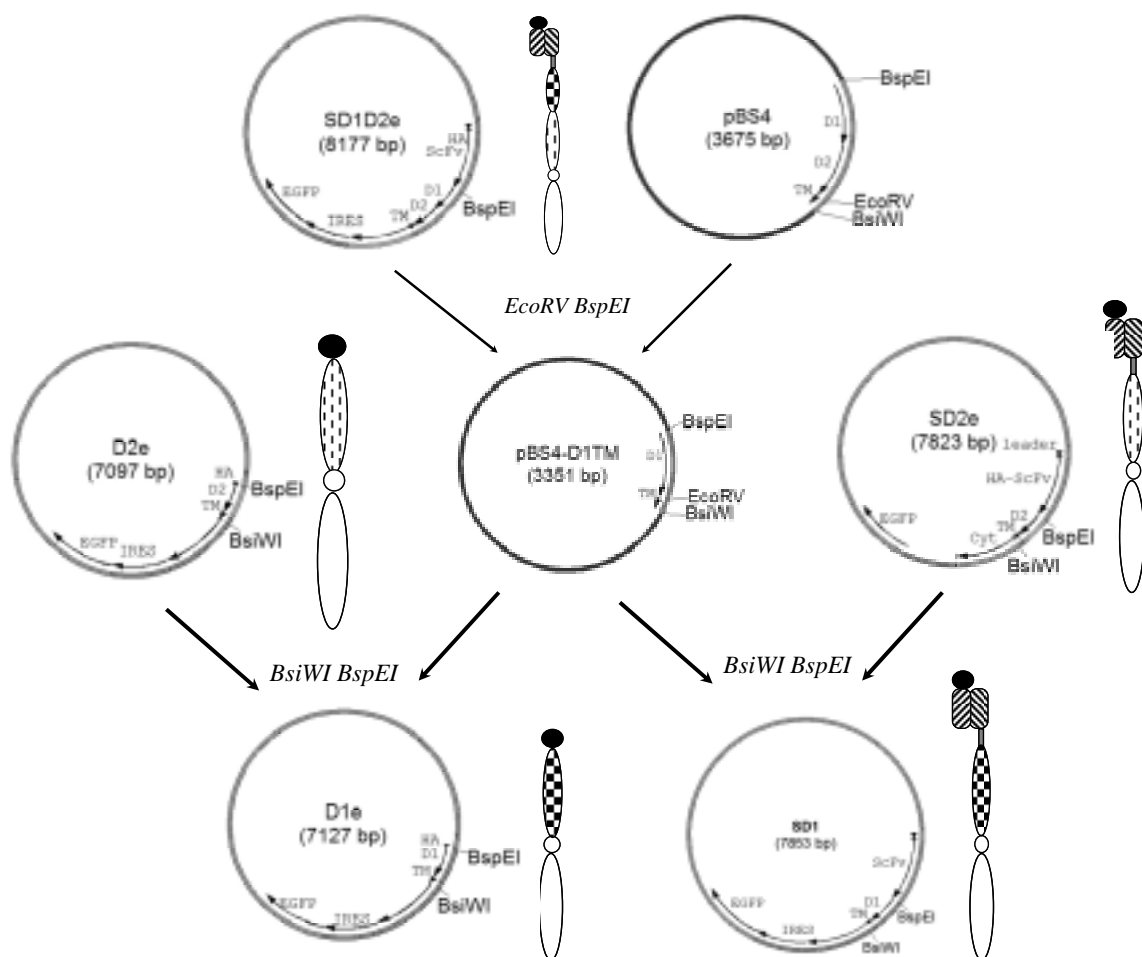


Fig. 4-7 抗体-受容体キメラ D1, SD1e の構築

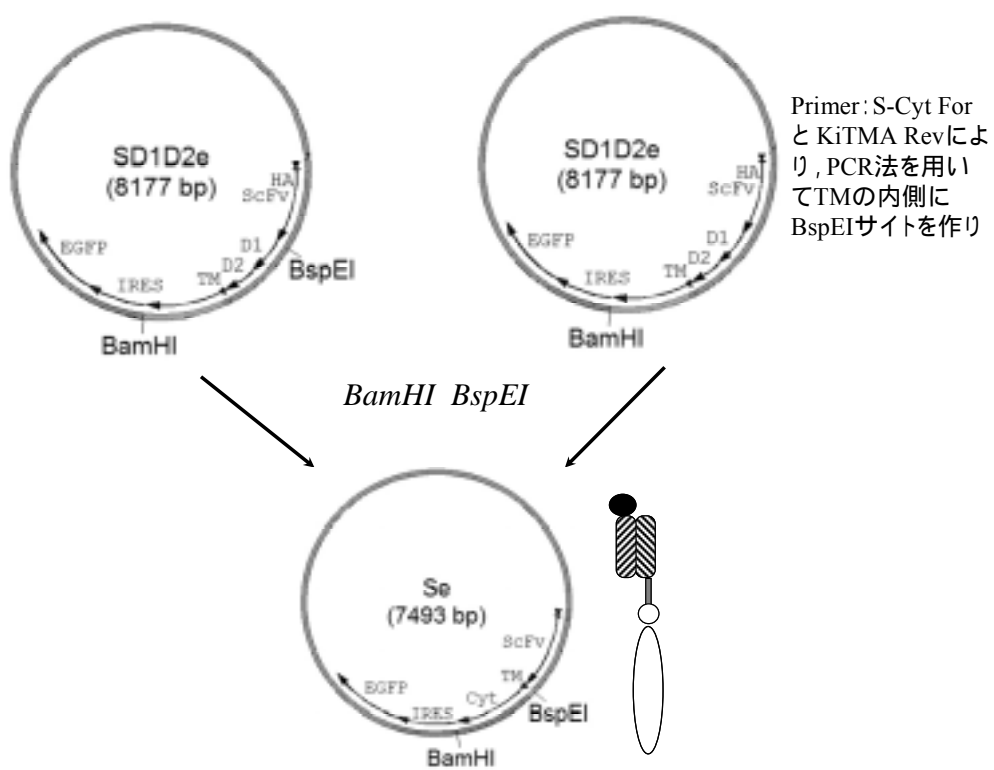


Fig. 4-8 抗体-受容体キメラ Se の構築

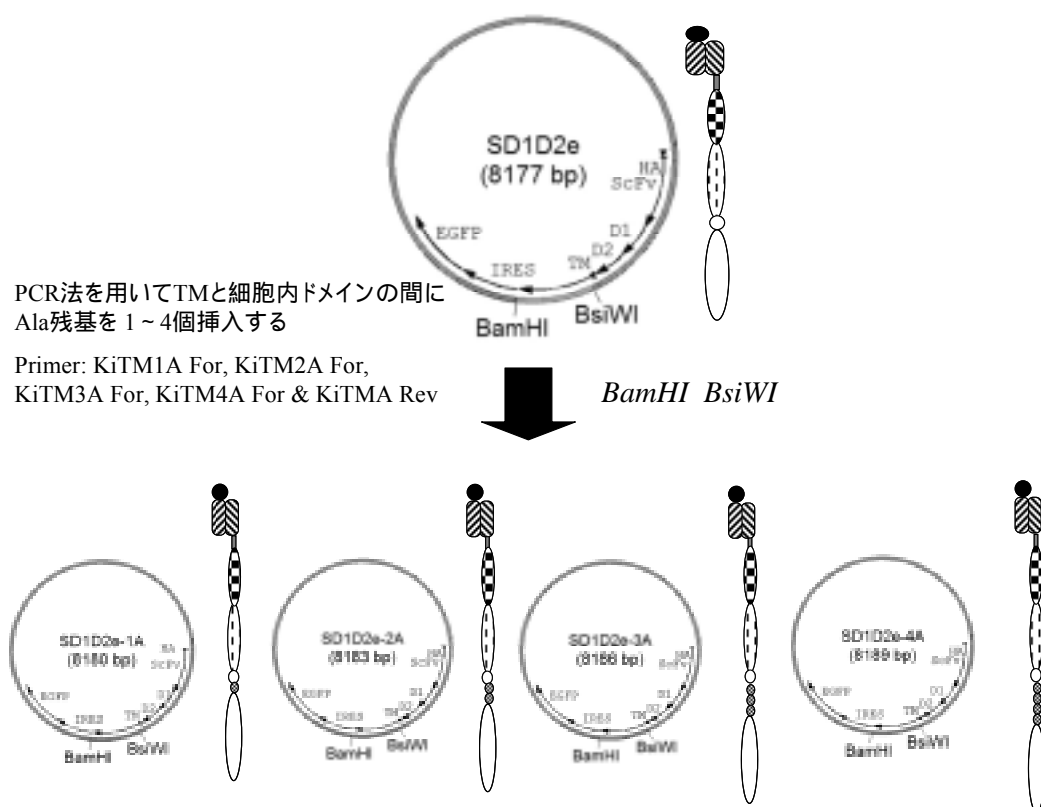


Fig. 4-9 抗体-受容体キメラ SD1D2e-1A～SD1D2e-4A の構築

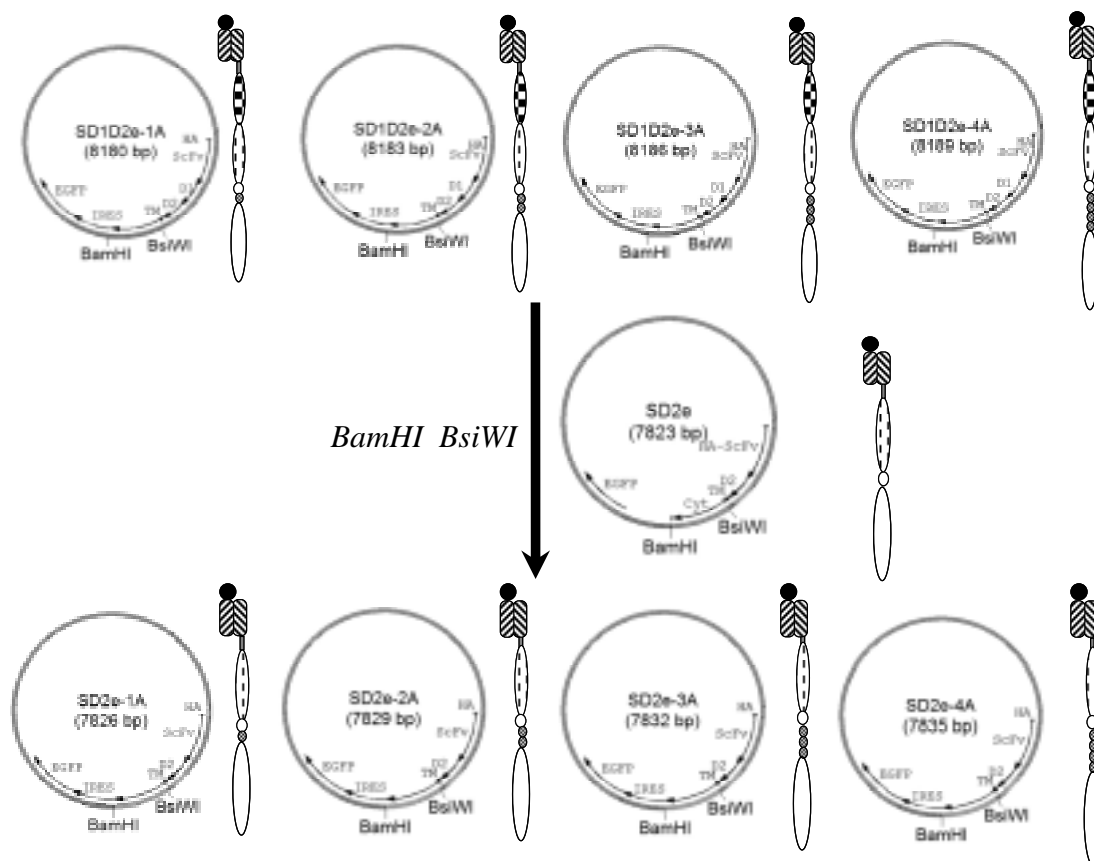


Fig. 4-10 抗体-受容体キメラ SD2e-1A～SD2e-4A の構築

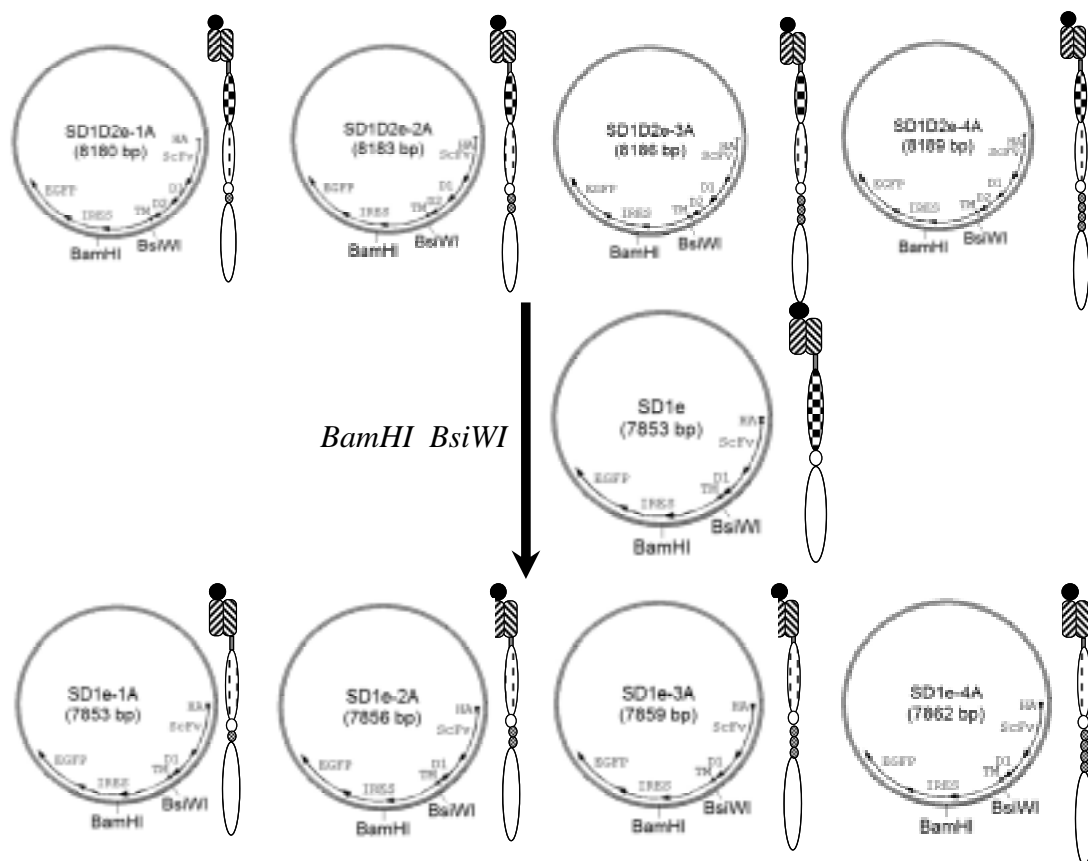


Fig. 4-11 抗体-受容体キメラ SD1e-1A～SD1e-4A の構築



Fig. 4-12 抗体-受容体キメラの遺伝子構造

構築した抗体-受容体キメラの遺伝子構造は Fig4-12 である。MoMLV レトロウイルスの LTR プロモーター(III)が構築した抗体-受容体キメラベクターの 5 ‘と 3’ 側にあり、抗体-受容体キメラ遺伝子は IRES により EGFP と共発現できるような構造になっている。EGFP はマーカー蛋白質として使われている。FACS 測定により遺伝子導入率などの測定ができる。

4.2.2. 形質転換

プラスミド DNA を細胞/大腸菌に導入することを形質転換といい、DNA を取り込み易くなった細胞/大腸菌をコンピテントセルという。大腸菌のコンピテントセルは対数増殖期の細胞を塩化カルシウム溶液で処理することによって得られる。さらにコンピテントセルを DNA 存在下で熱処理すると DNA の取り込みが促進される。構築した抗体-受容体キメラベクターにはアンピシリン耐性遺伝子断片が組み込まれてある。抗体-受容体キメラプラスミドを取り込んだ大腸菌はアンピシリン耐性となりアンピシリンを含む寒天培地でコロニーを形成することができる。

大腸菌コンピテントセルの作製と抗体-受容体キメラプラスミドの大腸菌コンピテントセルへの形質転換の具体的な操作は次のようである。実験に使用した大腸菌転換受容菌は XL-2 Blue 株(Stratagene, La Jolla, Calif.)である。実験に使用した LB 培地, SOC 培地, アンピシリン抗生物質溶液などに関して、生物学実験でもっとも基本的な一般物質であるから、詳しく説明はしないことにした。

1. XL-2 Blue 株大腸菌転換受容菌コロニーを 5mL の抗生物質なし LB 培地に移植し、37℃で一晩培養した。
2. 三角コルベン (300 – 500 mL) に入った 50 mL の LB にこの培養液の 1 mL を混釈した。37℃で 2-3 時間激しく振盪培養した。OD₆₀₀=0.4 になると直ちに氷冷した。
3. 50 mL ポリプロピレン・チューブに移し、5 分間遠心集菌する。(4 °C, 4000 rpm, 1600 g)
4. 上清を捨て、氷冷した 10 mL の塩化カルシウム溶液を加え懸濁した。
5. 5 分間遠心集菌した。(4 °C, 3000 rpm, 1100 g)
6. (4)と(5)を繰り返す。菌の沈渣に氷冷した 2 mL の塩化カルシウム溶液に懸濁する。100 μL ずつ 1.5 mL チューブに分注してから、直ちに液体窒素に投入して凍結させた。凍結したコンピテントセルは-80℃保存した。
7. 得られた菌懸濁液の 100 μL を 1.5mL チューブに移し、1-2μL のプラスミド DNA 溶液を加え、そして、4℃, 10 分氷冷した。
8. 熱処理を 42℃, 45 Sec 行った。
9. 1mL の SOC 培地を加え、37℃で 30 Min 培養した。
10. これらの培養液をアンピシリン 100 μg/mL 入り LB 寒天培地上に塗抹した。

4.2.3. 抗体-受容体キメラプラスミド抽出

QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN)を使用した。試薬 P1, P2, N3, PE Buffer は Kit に

含まれている。

1. 抗体-受容体キメラベクターを XL-2 Blue 株大腸菌コンピテントセルに形質転換して、アンピシリン 100 µg/mL 入り LB 寒天培地上に塗抹した。37°Cで一晩培養した。増えてきたコロニーを 5mL のアンピシリン 100 µg/mL 入り液体 LB 培地に移植し、37°Cで一晩振盪培養した。
2. 5 分間遠心集菌した。(4°C, 3000rpm, 1100g), 菌体を P1 Buffer (RNase 100 µg/mL) 250 µL に再懸濁させた。
3. P2 buffer を 250 µL 加えた後、穏やかに 4 - 6 回倒置攪拌した。
4. 溶液が透明になったら N3 buffer を 350 µL 加え、穏やかに 4 - 6 回倒置攪拌した。
5. 4°C, 15000rpm, 15 Min 遠心した
6. ステップ 5 の上清を, QIAprep spin column に移す。60 秒遠心し, カラムを通過した液を捨てた。
7. QIAprep spin column に 0.75 mL の PE buffer を加え, 30-60 秒遠心する。カラムを通過した液を捨て, さらに, 1 分間遠心し残っている溶液を完全に除いた。
8. 清潔なエッペンドルフチューブなどに QIAprep spin column を乗せ, DNA 抽出のために, 50 µL の EB buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) もしくは H₂O を QIAprep spin column の中心に乗せ, そのまま 5 分ほど放置してから, 1 分間遠心した。下の液には目的のプラスミドが含まれている。得たプラスミドの濃度を Nano Drop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE)で測定した。

4.2.4. Ba/F3 細胞の培養

Ba/F3細胞はIL-3 依存性細胞であり, 培地には1 ng/mL のIL-3 (Genzyme)を添加して培養した。培地は10% FBS (fetal bovine serum; BioWest), kanamycin 30 µg/mL 入りの RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, 日水製薬, 以下RPMI培地と記述する) を用い, 培養は37 °C, 5% CO₂インキュベータで行った。浮遊細胞であるから細胞を集める(洗浄する)ときは細胞懸濁液をファルコンチューブに移し, 室温室温, 3000g, 3 min 遠心し, 上清をアスピレーターで廃棄しペレットとしての細胞を得た。以下この操作を細胞収集(細胞洗浄)と記述する。

4.2.5. Plat-E 細胞の培養

培地は10% FBS, kanamycin 3 ng/mL 入りのDMEM (Dulbecco's modified Eagle medium,日水製薬, 以下DMEM培地と記述する) を用い, Blasticidin 10 µg/mL, Pnromycin 1 µg/mL を加えて, 培養は37 °C, 5% CO₂ インキュベータで行った。付着細胞であるので細胞を集める(洗浄する)ときは上清をアスピレーターで廃棄し, Trypsin EDTAを加えて37°C 5 min処理することにより細胞をDishからはがした。その細胞懸濁液をファルコンチューブに注入し, 20 °C, 3000g, 3 min 遠心し, 上清をアスピレーターで廃棄しペレットとして細胞を得た。以下この操作を, 細胞収集(細

胞洗浄)と記述する。

4.2.6. レトロウイルスによる細胞への遺伝子導入

レトロウイルスを利用して構築したベクターをBa/F3細胞に導入した。レトロウイルスを利用した遺伝子導入法には、遺伝子の運び屋としてのレトロウイルスベクターと、そのベクターにウイルスとして形を与える為のパッケージング細胞が必要である。レトロウイルスのパッケージング細胞 (今回の実験ではPlat-E細胞) にはレトロウイルスの構造遺伝子(gag,pol,env)が挿入されており、ウイルス粒子を形成するために必要なタンパク質を供給している。レトロウイルスベクターを導入してやると、そのRNA転写産物(つまりウイルスゲノム)を取り込んで組換え型レトロウイルスを産生する。

4.2.7. Retro Nectin (Takara Japan) を用いてウイルスをバイディングすると、レトロウイルスによる感染率は大きく改善される。

Retro Nectin処理Plateの作製手順：

1. -20°C に保存されてある25 $\mu\text{g/mL}$ Retro Nectinを室温で解凍した。
2. 24 Well Non-treated Plateに400 μL /wellを加える、1 Hr放置した
3. 上清をアスピレーターで吸い取る、この上清はさらに二回使いまわすのはできる。Plateを乾かさないうちにすばやく2%BSA/PBS (phosphate-buffered saline)溶液400 μL /wellを加える。30Min 室温でブロッキングを行った
4. 上清をアスピレーターで吸い取って捨てる。pH7.3~7.6, 1M HEPES 2.5%入りのHBSS Buffer (Hanks' Balanced Salt Solution Buffer) 600 μL /wellを加えた。
5. HBSS/HEPES Buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid Buffer) の入ったままで使うまで 4°C 保存した

4.2.8. 遺伝子導入手順

Day 1

1. Plat-E細胞を 2×10^6 cells/4 mL , DMEM (FBS(+), Km(+)) 培地で6cm dishにまき、16~24時間インキュベートした。

Day 2

2. 構築した抗体-受容体キメラ発現ベクターは大腸菌培養によって数 μg の量が得られる。2 μg 抗体-受容体キメラ遺伝子をエタノール沈殿、リンスでは70%EtOH 1mL入れ、数分逆さにして放置した後、遠心。クリーンベンチ内で上清を除き、乾燥させる。乾燥された遺伝子に2 μL の滅菌水で溶かした。
3. ポリエチレンチューブに抗体-受容体キメラの遺伝子溶液を移す、更に、125 μL DMEM (FBS(-), Km(-)) と20 μL Plus Reagentを加えてから、15 Min放置した。
4. ポリエチレンチューブに5 μL lipofectamine, 125 μL DMEM (FBS(-), Km(-)) を混合してから、15 Min放置後の3にあるポリエチレンチューブに添加する。さらに15

Min放置した。

5. Plat-E細胞の入った6cm Dishにある培地を3 mL DMEM (FBS(-), Km(-)) 培地で交換した。Dishに4で作った混合液を一滴ずつ加えた。
6. 3時間37°Cインキュベートした
7. 1 mL のDMEM (4×FBS, 4×Km) を加えてから、さらに24時間インキュベートした。

Day3

8. dishの上清をアスピレーターで吸い取り、DMEM (FBS(+), Km(+)) 培地を4 mL 加え、さらに24時間インキュベートした。

Day 4

9. dishの上清をポリエチレンチューブに移す。3000g, 5min 遠心した。
10. 用意したRetro Nectin dishのHBSS/HEPES Bufferをアスピレーターで吸い取り、遠心したウィルス上清を500 μ L /wellを加えた。3 Hr, 37°Cインキュベートした。
11. 上清をアスピレーターで吸い取り、Ba/F3細胞 2×10^5 を加える。RPMI(FBS(+), Km(+))で1 mL に足した。2 ng/mL のIL-3を加えた。
12. 37°C, 5%CO₂でインキュベートした。

4.2.9. フローサイトメーターによる遺伝子導入効率の確認

得られた細胞をPBSで一度洗浄した後、Isoflow (Beckman Coulter, Fullerton, CA).に再懸濁し、FACS Calibur (BD Biosciences, Mountain View, CA)を用いて測定を行った。

4.2.10. フローサイトメーターによる抗体-受容体キメラ表面発現の確認

構築した抗体-受容体キメラにHA-tagがついているので、蛍光標識した抗HA-tag抗体を用いて、フローサイトメーターにより抗体-受容体キメラの細胞表面での発現確認と発現量の測定ができる。操作手順：

1. 抗体-受容体キメラの導入した細胞を15000個集めた。
2. Buffer A (2% BSA (Sigama), 4% Donkey Serum (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) in PBS) を1 mL 加えて、懸濁してから、4°C, 30 Minでインキュベートした。
3. 3000g, 5min 遠心する。Rabbit polyclonal α HA 10 μ g/mL (Jackson ImmunoResearch,) in Buffer A 500 μ L 加えて、4°C, 60 Minでインキュベートした。
4. Buffer B (10% Buffer A)で3回洗浄した
5. α -Rabbit IgG(PE labeled) 12.5 μ g/mL (Jackson ImmunoResearch) in Buffer A 500 μ L 加えて、4°C, 60 Minでインキュベートした。
6. Buffer Bで3回洗浄した
7. Buffer Bの中でFACSにかけて、表面発現量の測定を行った

4.2.11. BSA-FLの作製

1. ポリエチレンチューブにBuffer(0.25M Na₂CO₃, 0.1M NaCl)5 mL にBSA (Sigma) 75 mg, FITC(Sigma) 3.75 mgを加えた. チューブをアルミで包む, 4°C, 回転させながらOver Night反応した.
2. PBSでWashしたNAP10カラム(GE Healthcare) にOver Night反応した液を加えた. カラムから出た液の最初数滴を捨てて, その後に出た液はBSA-FL溶液である.
3. アルブミンStandard Fluid (Pierce Biotechnology)で作った検量線により, 作製したBSA-FL溶液の濃度を測定した.
4. UVに対する吸光度測定により, 一つのBSAの上についたFLの数も測定した.

4.2.12. FL dimer (13 mer)の作製

オリゴテクノマート (www.hisco.co.jp/dna-oligo/cgi/index/) に5' 末端をFL修飾したs-Oligo DNAを発注した, 13mer: FL-TGGGCGGCCGCsCsC, sはS-Oligoであり, ヌクレアーゼ分解を防ぐために挿入した. 入手した5' 末端FL修飾s-Oligo DNAは サーマルサイクラーで70°Cを5分後, 0.1°C/10秒で20°Cまで冷却することでアニーリングさせた.

4.2.13. BSA-FLによる直接選択

構築した抗体-受容体キメラの遺伝子を導入した細胞の遺伝子導入率はFACSで測定したあと, BSA-FLを用いて直接選択を行った. IL-3を除去するために, 遺伝子導入された細胞をPBSで3回洗浄した, 24wellに細胞を加えて, 10 µg/mL BSA-FLを添加して直接選択を行った.

4.2.14. 刺激実験

本研究では抗体-受容体キメラドメインのシグナル伝達に対する影響を調べるために, 複数のリガンドを使って刺激実験を行った. EGFP陽性の細胞をPBS Washにより培地中のIL-3を洗浄してから12時間 depletionさせた. その後は67 pM IL-3, 76 nM BSA-FL, 164 pM Epo, 400 nM FL dimer-13, 67 nM mouse anti-HA antibodyまたは67 nM mouse anti-HA antibodyプラス125 nM anti-mouse IgGを培地に加えて, 37°C, 15 Min刺激した. その後はサンプルを氷上に移して, あらかじめ氷冷しておいた2 mM Na₃VO₄を添加して, さらに氷の上に15 Min置いた. 4°C, 3000rpm, 3Min遠心により細胞を集めた. 細胞ライセートを取ってWestern Blottingにより蛋白質リン酸化状況を調べた.

4.2.15. Western blottingによる抗体-受容体キメラの発現確認

1. 1×10^6 cellsを集めて, PBSで1回洗浄した細胞をleupeptin,aprotininをそれぞれ1 µLずつ加えたSolubilization Buffer(20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA)100 µL に懸濁させ, on iceで10分間放置した.

2. 4°C, 3000g, 15 min遠心し, 回収した上清に4×レムリ Bufferを加えて10分間boilした.
3. ガラス板の間にSeparating gel(7.5%) (30% acrylamide+0.8% bisacrylamide 1.8 mL, 4×Tris-Cl/SDS (pH8.8) 1.8 mL, 水 3.5 mL, 10% APS(ammonium persulfate) 72 µL, TEMED 10 µL)を加えて, 上に更に1 mL 2-プロパノールを加える. 1 Hr放置した.
4. 2-プロパノールを吸い取る. 残るのも蒸発させ, Stacking gel (30% acrylamide+0.8% bisacrylamide 0.65 mL, 4×Tris-Cl/SDS (pH6.8) 1.25 mL, 水3.05 mL, 10% APS(ammonium persulfate) 20 µL, TEMED 2 µL)を加えて, コームをさした
5. ゲルの各wellにサンプルをロードし, separating gelに入るまでは12 mA, その後は15 mAで泳動した.
6. Semi-Dry Blotting Bufferを2トレイに注ぎ, 一方に泳動後のseparating gelを切り捨てたstacking gel部分のみを, もう一方にニトロセルロース膜(Millipore, Bedford, MA)と濾紙を濾紙, 膜, 濾紙の順で浸し, 30分間穏やかにshakeした.
7. Semi-Dry Blotterに濾紙, 膜, ゲル, 濾紙の順で置き, 200 mA, 15Vで40分Blottingした.
8. 膜の転写された面を上にしてTBS-T(0.1% Tween20 in TBS)で3分間shake後, Blocking One (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan)に浸して室温, 2時間~over nightでshakeした.
9. 溶液を廃棄し, TBS-Tに浸して15分間shakeを2回繰り返した後に1 µg/mL の一次抗体を含むTBS-T溶液に浸し, 穏やかに1 Hr shakeした.
10. 溶液を廃棄し, TBS-Tに浸して15分間shakeを3回繰り返した後に1 µg/mL のHRP (horseradish peroxidase)標識二次抗体を含むTBS-T溶液に浸し, 穏やかに 1 Hr shakeした.
11. 溶液を廃棄し, TBS-Tに浸して15分間shakeを 3 回繰り返した後にECL(enhanced chemiluminescence) Kit (Nakalai, Kyoto, Japan)により発光反応を起こし, X線Film (Fuji-RX, Fuji Film, Tokyo, Japan)に感光させ現像した.

4.2.16. 抗体

蛋白質を検出するためにいろいろな抗体を使用した. 本研究で使用した抗体としては, 抗体-受容体キメラのBaF3細胞での発現にanti-EpoR C-20(sc-695; anti-human EpoR, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を使用した.

複数のリガンドを使って刺激して, シグナル伝達に対する影響を調べるために, シグナル伝達経路における複数のシグナル伝達に関与する蛋白質のリン酸化状況を調べた. 調べた対象はJAK2, STAT5とERK1/2であった. 使用した抗体はrabbit anti-mouse JAK2 (Upstate Biotechnology), rabbit anti-Phospho-Tyr1007/1008-JAK2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), rabbit anti-mouse STAT5 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Phospho-Tyr694-Stat5 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), rabbit anti-mouse ERK (Santa Cruz Biotechnology), anti-ACTIVE MAPKpAb (Promega Corp, Madison, WI,

USA)をリン酸化ERK 1とERK 2の検出に使った、二次抗体は HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Biosource, Camarillo, CA)を使用した。

それぞれのリガンドの刺激によるJAK2, STAT5とERK1/2のリン酸化程度を比較するために、バンドの濃さをソフトImage J (rsb.info.nih.gov/ij/docs/intro.htm)により定量をした。IL-3を使って刺激したサンプルの構成的発現を100として、JAK2, STAT5とERK1/2の構成的発現量を規格化して、さらに、JAK2, STAT5とERK1/2のリン酸化程度は、ポジティブコントロールとしてIL-3を使って刺激した結果を100としてバンドの濃さを定量して規格化した。構成的発現量に対するリン酸化された部分の割合でプロットした。

4.2.17. Growth Assay

構築した抗体-受容体キメラのリガンド濃度依存性を評価するために、Growth Assayを行った。抗体-受容体キメラが遺伝子導入された細胞をBSA-FLにより直接選択後、遺伝子導入率100%になった細胞を集めて、PBSで3回洗浄した後、96 well plate, 3000 cells/well, RPMI培地100 μ L /well リガンド濃度は0, 1.5, 7.5, 15, 61, 122, 152nMを加える。37°C 5%CO₂インキュベートした。

一定培養時間後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Japan) 10 μ L /wellを加えて、37°C 4時間発色反応させた後、Plate ReaderでそれぞれのWellの450nm吸光度を測定した。検量線により細胞数を算出できる。

抗原特異性を確認するために、BSA-FLのほかに、BSA (Sigma), fluorescein sodium salt (free FL; Sigma), Ovalbumin (OVA, Inject Ovalbumin; Pierce Biotechnology, Rockford, IL) and fluorescein-conjugated OVA (OVA-FL, Molecular Probes, Eugene, OR)も使ってGrowth Assayを行った。

4.3. 実験結果

4.3.1. ベクター構築

EpoRの細胞外ドメインと細胞内ドメインの配向性の抗体-受容体キメラシグナル伝達に対する影響を調べるために、Fig. 4-13 に示した 19 種類の抗体-受容体キメラを構築した。

まず、ScFvを直接に Wild-type EpoR 細胞外 D1D2 ドメインに融合した抗体-受容体キメラ SD1D2e を構築した。細胞外ドメインのシグナル伝達に対する影響を調べるために、D1 ドメインまたは D2 ドメインを削除した抗体-受容体キメラ SD2e と SD1e を構築した。さらに、細胞外 D1D2 ドメインを全部削除して、ScFv を直接に膜貫通ドメインに融合した抗体-受容体キメラ Se を構築した。

Constantinescu らの報告によると(6), EpoR 膜貫通ドメインと細胞内ドメインの十数個のアミノ酸残基はアルファヘリックス構造になり、そのアルファヘリックス構造の中への Ala 残基の挿入により、細胞内ドメインの角度変化が引き起こされる。彼らの

計算によると、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を一つ入れると、細胞内ドメインの角度が 110 度変化すると予測した。実際の細胞増殖活性もその予測を証明できた。彼らの研究結果を参考にして、EpoR 細胞内ドメインコンホメーション変化の抗体-受容体キメラシグナル伝達に対する影響を調べるために、構築した抗体-受容体キメラ SD1D2e, SD2e と SD1e をベースにして、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を一つから四つまで挿入して、抗体-受容体キメラ SD1D2e-1A ~ SD1D2e-4A, SD2e-1A ~ SD2e-4A と SD1e-1A ~ SD1e-4A を構築した。Fig. 4-13 には構築した 19 種類の EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラを示した。検出に使うために構築した抗体-受容体キメラの N 末端に HA-tag を付加した。

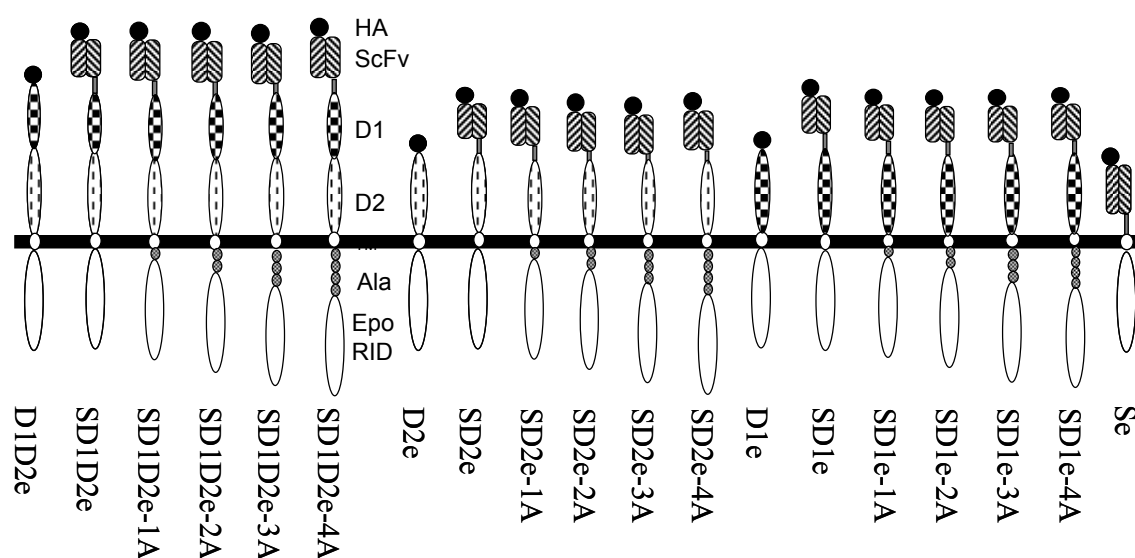


Fig. 4-13 構築した EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラ

4.3.2. FuGene6 と Lipofectamine による導入率の比較

構築した抗体-受容体キメラ遺伝子を BaF3 細胞へ導入するために、まず、抗体-受容体キメラ遺伝子をパッケージング細胞である Plat-E に導入して、Plat-E から目的の抗体-受容体キメラ遺伝子を含むレトロウィルスを放出させ、このレトロウィルスを使って、IL-3 依存性 pro-B 細胞株 Ba/F3 を感染させ、抗体-受容体キメラを細胞表面に発現させた。

遺伝子を細胞にレトロウィルスを用いて導入するときに、Fugene-6 transfection reagent (Roche Diagnostic corporation, Indianapolis, IN) と Lipofectamine (Invitrogen) の二種類の試薬がある、同じような実験操作を行って、遺伝子導入効率を比較した。結果は Fig.4-14 に示した。その結果、Fugene-6 より Lipofectamine のほうの導入率が高いことが分かった。細胞の種類により最適なりポフェクション試薬は異なるが、パッケージング細胞として Plat-E を使って遺伝子を Ba/F3 細胞に導入する場合には Lipofectamine のほうが優位であることがわかった。

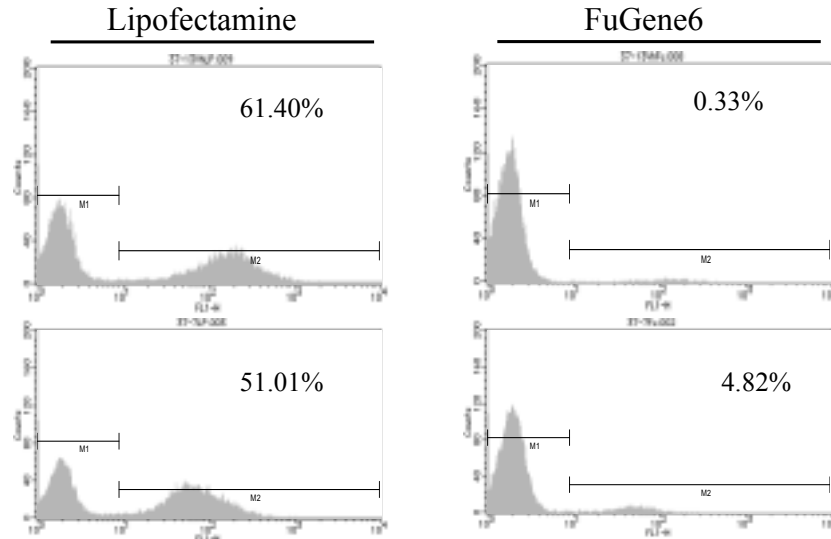


Fig. 4-14 Lipofectamine と FuGene6 による遺伝子導入率の比較

4.3.3. 遺伝子導入及び BSA-FL による選択

抗体-受容体キメラ遺伝子を BaF3 細胞に導入した，最初は EGFP の陽性率が数パーセントだった．そこで IL-3 を PBS で Wash により除去してから，BSA-FL 10 $\mu\text{g/ml}$ を添加して培養することにより，いずれも GFP 陽性率 100%の細胞を得た．Fig. 4-15 では代表例であるが，抗体-受容体キメラ SD1D2e-1A～SD1D2e-4A の遺伝子導入率は最初は 10%程度しかなかったが，BSA-FL 添加培養により，数日間後いずれも 100%になった．そのほかの抗体-受容体キメラに関しても同じような結果が得られた．

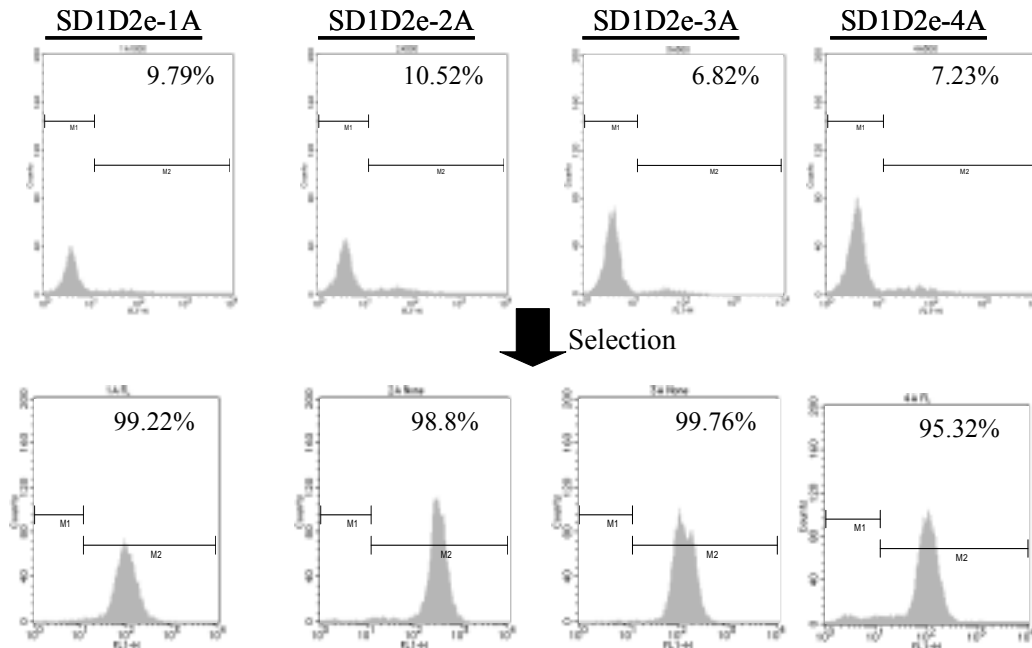


Fig. 4-15 抗体-受容体キメラは BaF3 細胞に遺伝子導入した後，BSA-FL 添加培養による Selection を行った結果

4.3.4. 抗体-受容体キメラの BaF3 細胞での発現確認

抗体-受容体キメラ D1D2e (54.1 KDa), SD1D2e (79.6 KDa), SD1D2e-1A ~ SD1D2e-4A (79.6 KDa), D2e (41.3 KDa), SD2e (66.6 KDa), SD2e-1A ~ SD2e-4A (66.6 KDa), D1e (52.5 KDa), SD1e (67.8 KDa), SD1e-1A ~ SD1e-4A (67.8 KDa), Se (54.8 KDa)を遺伝子導入した EGFP 陽性率 100%の細胞のライセートを取って, Western Blotting により細胞での発現を確認した (Fig. 4-16). 一次抗体として polyclonal anti-EpoR (C-20) (Santa Cruz Biotechnology), 二次抗体として HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Biosource, Camarillo, CA)を使用した. その結果すべての抗体-受容体キメラの細胞での発現が確認できた.

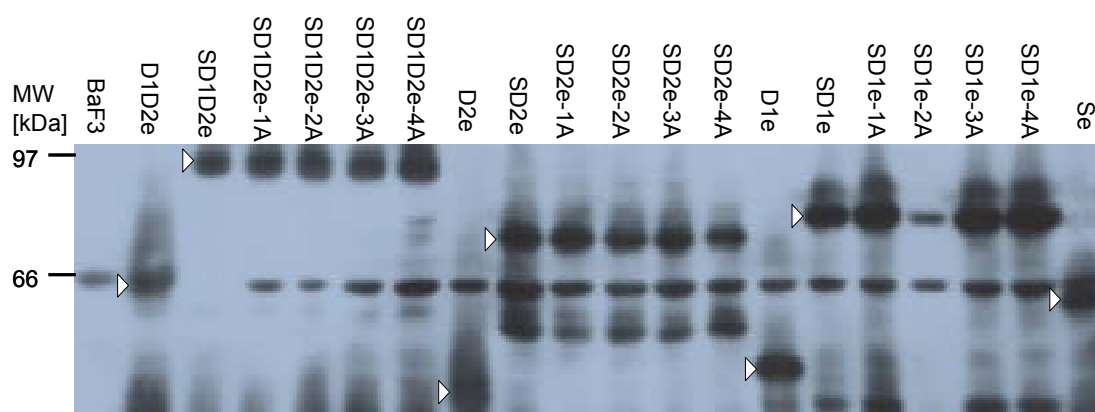


Fig. 4-16 抗体-受容体キメラの細胞での発現を示す Western Blotting 確認結果

4.3.5. 抗体-受容体キメラの BaF3 細胞表面での発現確認

受容体の細胞表面での発現量はシグナル伝達に影響を与える. 今までの報告により, 細胞内で新しく翻訳された EpoR の大部分は小胞体に止まって分解され, ほんのわずかが小胞体を通して細胞表面に発現できることが分かった(112-116). 構築した抗体-受容体キメラの N 末端に HA-tag が付加されているので, 一次抗体として mouse monoclonal anti-HA (Babco, Richmond, CA), さらに二次抗体として R-Phycoerythrin (PE)-conjugated donkey F(ab')₂ anti-mouse IgG を使って, FACS Calibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Lexington, KY), 励起波長が 488 nm, 蛍光検出波長が 585 ± 21 nm の条件で, 細胞表面での発現レベルを測定した (Fig. 4-17). 白いヒストグラムは HA-tag のついてない抗体-受容体キメラを使って測定した結果であり, ネガティブコントロールとして使った. 黒い部分が実際各キメラ発現細胞を測定した結果である. M は PE 蛍光強度の中間値 (メディアン) であり, 抗体-受容体キメラの細胞表面での発現量の指標として用いた.

構築した抗体-受容体キメラを細胞外ドメインにより三つのグループに分けた.
D1D2 抗体-受容体キメラ : D1D2 ドメインを共に持つ抗体-受容体キメラ, D1D2e, SD1D2e, SD1D2e-1A ~ SD1D2e-4A.

D1 抗体-受容体キメラ : D1 ドメインのみ持つ抗体-受容体キメラ, D1e, SD1e,

SD1e-1A ~ SD1e-4A.

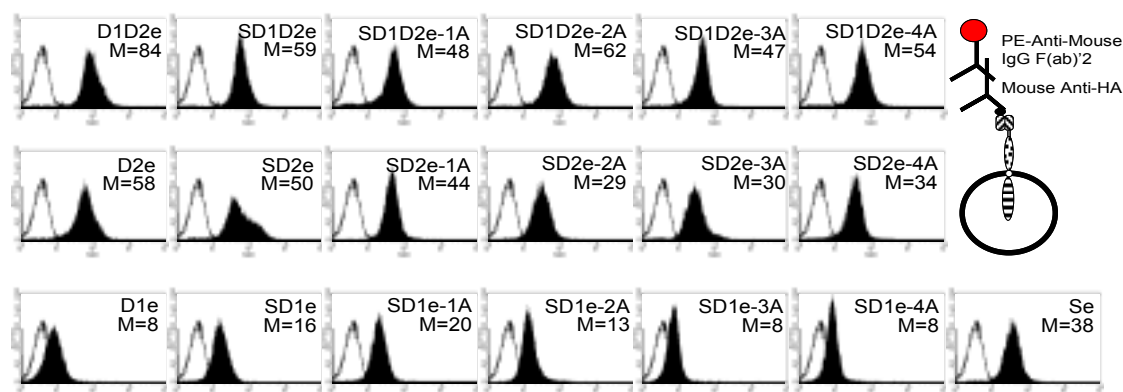


Fig. 4-17 抗体-受容体キメラの細胞表面での発現を測定した結果

D2 抗体-受容体キメラ : D2 ドメインのみ持つ抗体-受容体キメラ, D2e, SD2e, SD2e-1A ~ SD2e-4A. すべての抗体-受容体キメラの BaF3 細胞での発現が確認できた. しかし表面発現量を示すメディアン値分布は 8 (SD1e-3A) から 84 (D1D2e) まで幅広かった. D1D2 抗体-受容体キメラの表面発現量は D1 抗体-受容体キメラまたは D2 抗体-受容体キメラの発現量より多く, D1 抗体-受容体キメラの表面発現量は一番低いことがわかった(Fig. 4-18). このことから細胞外ドメインは抗体-受容体キメラの細胞表面での発現量に大きく影響していることが示唆された.

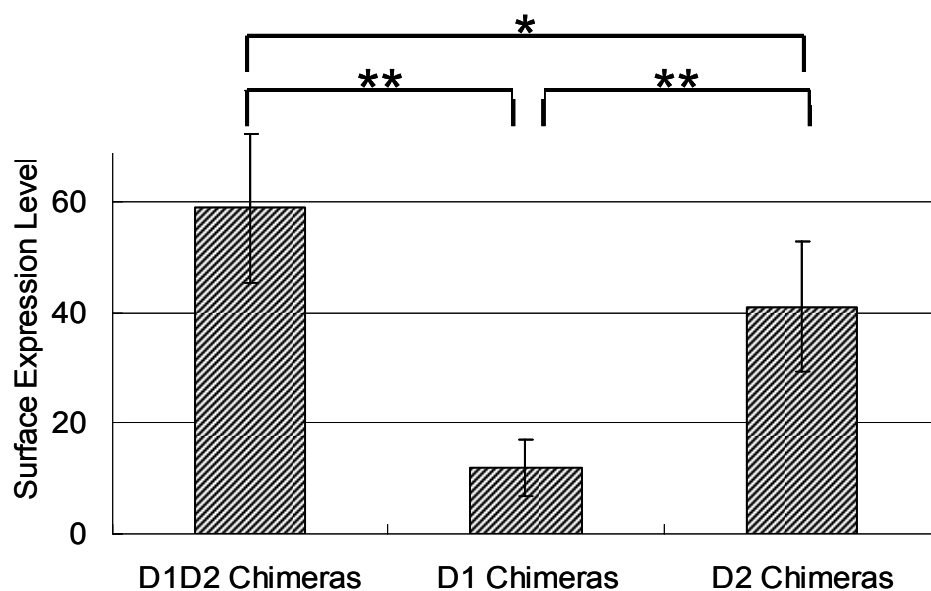


Fig. 4-18 D1D2 キメラ, D1 キメラと D2 抗体-受容体キメラの表面発現量の比較

*: 0.01 < P < 0.05, **: P < 0.01

4.3.6. BSA-FL に対する抗原依存性増殖

構築した抗体-受容体キメラを発現した BaF3 細胞の抗原 BSA-FL に対する増殖依存

性を評価するために、Growth Assay を行った。抗原 BSA-FL は BSA の上に FL を修飾したものであり、構築した抗体-受容体キメラの Anti-FL ScFv 部分と結合でき、抗体-受容体キメラのダイマーまたはオリゴマーを誘導してシグナル伝達経路を活性化して、細胞増殖を誘導すると考えられる。以前の報告でリガンドと細胞外ドメイン複合体の立体構造上にあるわずかな差だけで、リガンドの性質が大きく変わり、アゴニストまたはアンタゴニストとして機能した(106, 107)。抗体-受容体キメラ細胞外ドメインの立体構造はシグナル伝達に大きな影響を持っていることが考えられる。抗原 BSA-FL に対する増殖依存性を評価できる Growth Assay により EpoR 細胞外ドメインまたは細胞内ドメインの配向性変化のシグナル伝達に対する影響を考察できる。

抗体-受容体キメラを発現した細胞を PBS で三回 Wash することにより、培地中の IL-3 を除去してから、96-well plate に 2000 cells /100 μ L /well を加えて、0, 1.5, 7.5, 15, 61, 122 と 152 nM の BSA-FL を添加してから三日間培養後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Japan)試薬を使って細胞数を数えた。結果は Fig. 4-19 に示した。ScFv が融合されていない抗体-受容体キメラをネガティブコントロールとして使った。その結果予想通り D1D2e, D2e と D1e には BSA-FL に対する応答性はなかった。

細胞外ドメインの差により、抗原 BSA-FL に対する応答性はいくつかのパターンに分かれた。EpoR 細胞外ドメイン D1 と D2 を両方持つ抗体-受容体キメラ(SD1D2e, SD1D2e-1A ~ SD1D2e-4A)では BSA-FL が Agonist として働いた。SD1D2e が BSA-FL の添加に応答して細胞増殖したが、その応答性は Ala 残基一つから三つの挿入によって大きく抑制され、抗体-受容体キメラ SD1D2e-1A ~ SD1D2e-3A では殆ど応答性がなくなってしまった。また、その抗原応答性が SD1D2e-4A では四つの Ala 残基の挿入により大きく回復された。

一方、EpoR 細胞外ドメインが D2 のみの抗体-受容体キメラ(SD2e, SD2e-1A ~ SD2e-4A)では BSA-FL が Inverse Agonist として働いた。SD2e が BSA-FL の添加に応答して細胞増殖したが、その応答性が Ala 残基一つの挿入によって大きく抑制され (SD2e-1A)、Ala 残基二つまたは三つを挿入した抗体-受容体キメラ SD2e-2A と SD2e-3A では抗原応答性が大きく回復した。また、四つの Ala 残基の挿入により、SD2e-4A が SD2e-1A と同じように抗原応答性がなくなった。

EpoR 細胞外ドメインが D1 のみの抗体-受容体キメラ(SD1e, SD1e-1A ~ SD1e-4A)では BSA-FL に対する応答性はなかった。SD1e のみはリガンド非依存性細胞増殖があったが、その細胞増殖も Ala 残基一つから四つの挿入によってなくなった。EpoR 細胞外ドメイン D1D2 が共に削除され、ScFv が直接に膜貫通ドメインに融合された抗体-受容体キメラ Se では BSA-FL が強い Inverse Agonist として機能した。

リガンドと細胞外ドメイン複合体の立体構造上にあるわずかな差だけで、リガンドの性質が大きく変わり、アゴニストまたはアンタゴニストとして機能した報告はある (106, 107)。本研究では構築した抗体-受容体キメラ細胞外ドメインの差で、抗原である BSA-FL に対する細胞増殖依存性も大きく変わり、BSA-FL は Agonist, Inverse Agonist または影響なしとして機能した。細胞外ドメインは抗原応答性シグナル伝達

に大きく影響していることが示唆された。

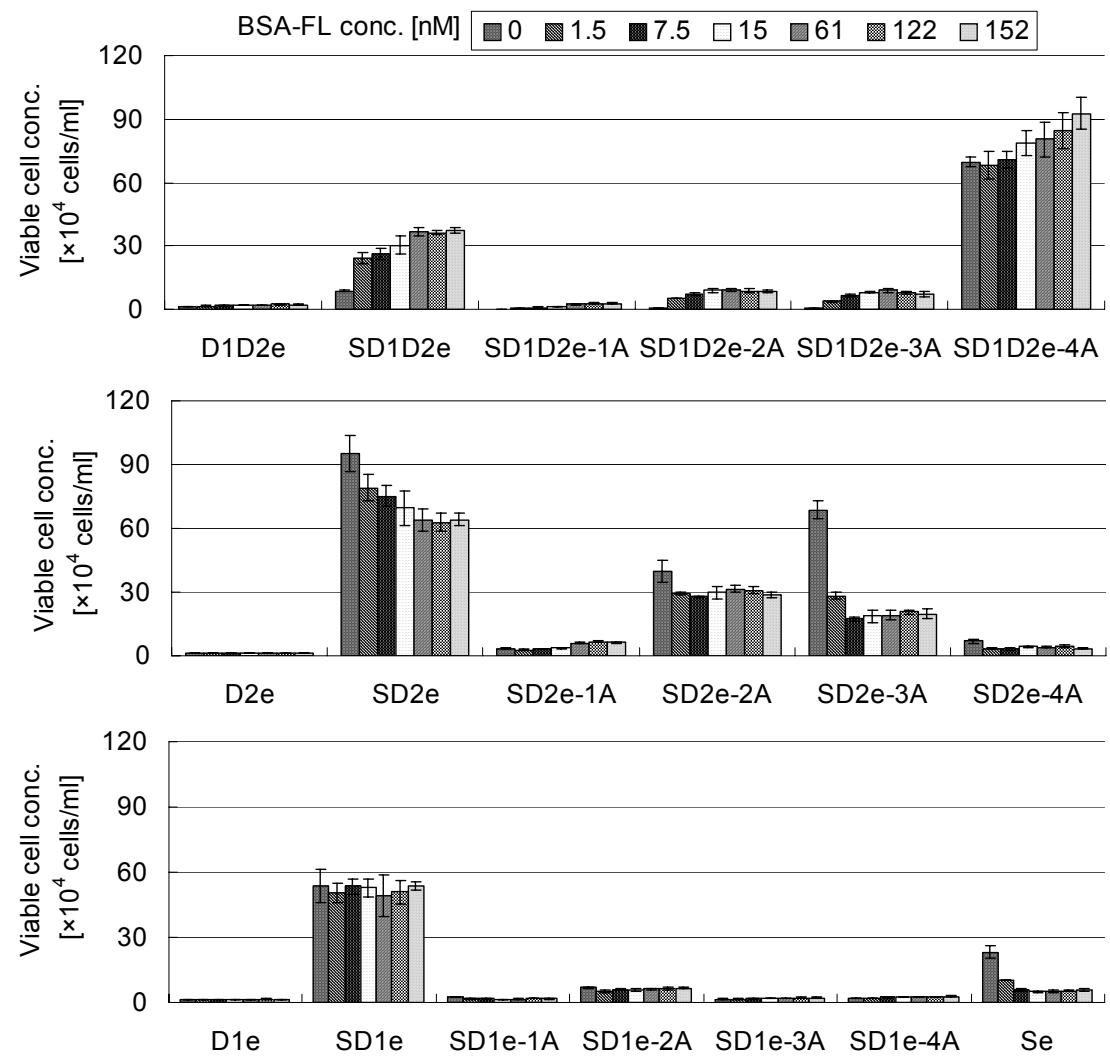


Fig. 4-19 BSA-FL に対する抗原依存性細胞増殖結果

4.3.7. 表面発現量と抗原応答性の相互関係

サイトカインは細胞表面に発現されるサイトカインレセプターと結合して、レセプターダイマーまたはオリゴマーを誘導してシグナル伝達することから、細胞表面に発現するレセプターの量も重要であると考えられる。本研究で構築した抗体-受容体キメラの細胞表面での発現量は抗体-受容体キメラの構造によって大きな差を示した (Fig. 4-18)。表面発現量の抗原応答性との相互関係を考察するために、構築した抗体-受容体キメラの 60 nM BSA-FL に対する増殖応答を縦軸に、それぞれの抗体-受容体キメラの細胞表面発現量を横軸にしてプロットしたのが Fig. 4-20 である。

BSA-FL に対する抗原依存性増殖が一番高いのは SD1D2e-4A であったが、抗体-受容体キメラ SD1D2e, SD1D2e-2A の表面発現量は SD1D2e-4A より高かったにも関わらず、抗原依存性細胞増殖応答は SD1D2e-4A より低かった。また SD1e の表面発現量は SD1D2e-2A, SD2e-2A などの抗体-受容体キメラよりはるかに低かったにもかかわらず、高い細胞増殖活性を示した。結果から見れば、細胞増殖抗原応答性は細胞表面発現量にも多少の相関はあるが、抗体-受容体キメラの構造にも大きく影響されることが示唆された。

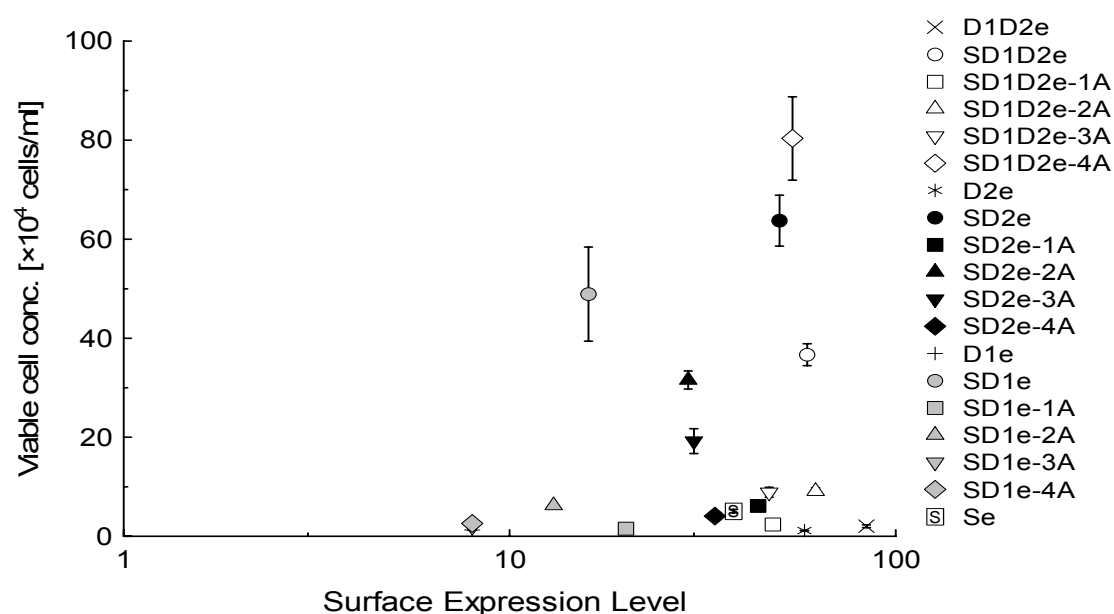


Fig. 4-20 抗体-受容体キメラの細胞表面発現量と抗原依存性細胞増殖応答との関係

4.3.8. 抗原特異性

構築した抗体-受容体キメラの N 末端に融合した抗体 ScFv 31IJ3 Clone の抗原は FL であり、本研究の中ではキャリアー蛋白質として BSA を使用した、キャリアー蛋白質の影響を調べるために、OVA に FL を修飾した OVA-FL を抗原として使用した。吸光度測定により一つのキャリアー蛋白質に何個の FL がついているかを計算できる。本研究で使用した BSA-FL と OVA-FL では平均として一つのキャリアー蛋白質の上に二つの FL がついていることが分かった。そのほかに、フリー状態のキャリアー蛋白質である BSA と OVA の影響を調べるために、それらを使った Growth Assay 実験も行

った. 同じ BSA または OVA 分子上に融合した FL 分子は別々の抗体-受容体キメラにある ScFv と結合することにより, 抗体-受容体キメラダイマーまたはオリゴマーを誘導すると考えられる. そこでフリー状態の FL を添加すると, ダイマーまたはオリゴマーの誘導効果を阻害できると考えられる. それを検証するために, BSA-FL または OVA-FL を添加した培地にフリー状態の FL も添加して, 細胞の抗原応答性を評価した. BSA-FL に対する細胞増殖応答性を示した SD1D2e, SD1D2e-4A, SD2e, SD2e-3A と SD1e を代表として選んだ. この中で, BSA-FL は SD1D2e と SD1D2e-4A に対して Agonist, SD2e と SD2e-3A に対して Inverse Agonist として機能し, SD1e に対して影響がなかった. これらの抗体-受容体キメラを選んで, Growth Assay を行い, BSA-FL に対する抗原特異性を評価した.

結果は Fig. 4-21 に示した. すべての抗体-受容体キメラは BSA, OVA またはフリー状態の FL に対する応答はなかった. OVA-FL に対する増殖応答性は BSA-FL とほぼ同じであることが分かった. フリー状態の FL を添加した BSA-FL+FL または OVA-FL+FL では, フリー状態の FL により抗体-受容体キメラの BSA-FL または OVA-FL に対する応答が阻害されることが分かった. 以上より, BSA-FL 抗原特異性がキャリアー蛋白質に関係がないことが分かった. また, フリー状態の FL の添加により抗原応答性が減少したことから, 同じ BSA 分子上に融合した FL の別々の抗体-受容体キメラとの結合により受容体ダイマーまたはオリゴマーを誘導することが示唆された.

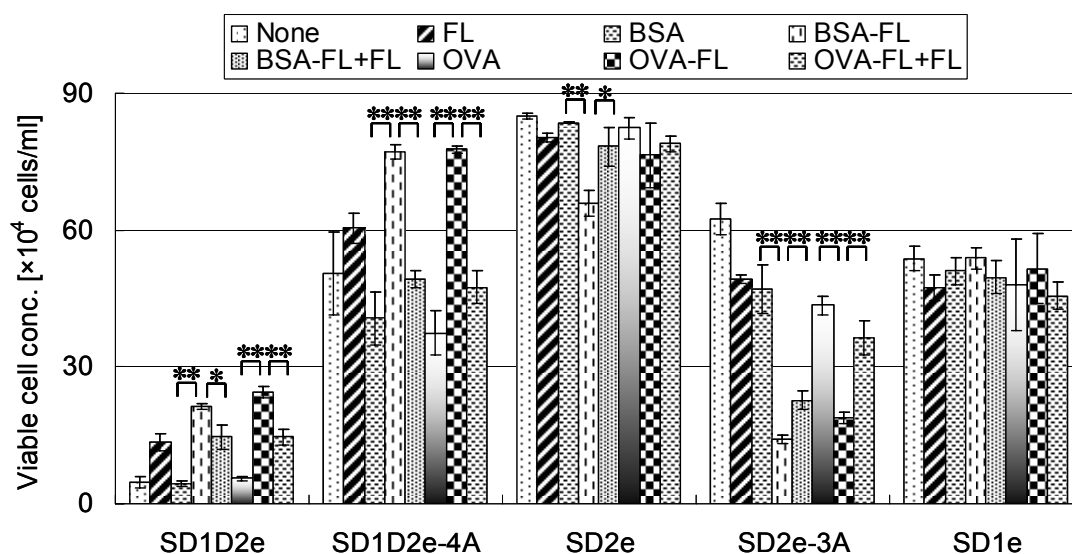


Fig. 4-21 抗体-受容体キメラの細胞増殖の抗原特異性 **: $P < 0.01$, *: $0.01 < P < 0.05$

4.3.9. 抗体-受容体キメラ刺激実験

EpoR によるシグナル伝達メカニズムとしては, まず細胞外ドメイン D1 が Epo との結合によりコンホメーション変化を引き起こし, それにより細胞内ドメインが近づき, すでに細胞内ドメインに結合した JAK2 がお互いにリン酸化を行う. リン酸化された JAK2 はレセプター細胞内ドメインにある 8 つのチロシンをリン酸化する. SH2

ドメインを持つシグナル伝達蛋白質がそのリン酸化されたチロシンに結合してからシグナル伝達するというメカニズムになる。

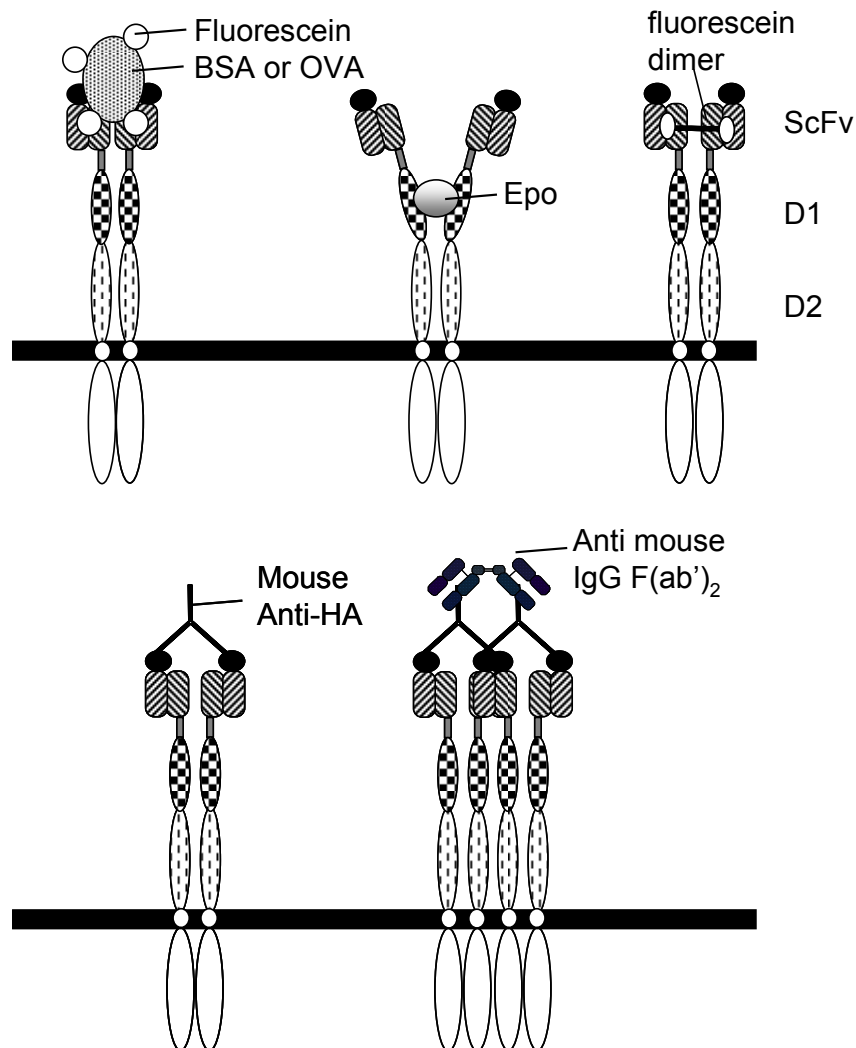


Fig. 4-22 複数のリガンドによる抗体-受容体キメラ複合体の誘導

構築した抗体-受容体キメラ中の EpoR 細胞外ドメインまたは細胞内ドメインの配向性の変化のシグナル伝達に対する影響を調べるために、複数のリガンドによる刺激実験を行った(Fig. 4-22). ①, BSA-FL または OVA-FL による刺激. BSA または OVA に修飾した FL が抗体-受容体キメラにある ScFv と結合してダイマーまたはオリゴマーを誘導する. ②, Epo による刺激. EpoR 細胞外 D1 ドメインの持つ抗体-受容体キメラの D1D2 キメラと D1 キメラでは, Epo が D1 ドメインと結合することにより抗体-受容体キメラダイマーを誘導できる. ③, FL dimer 13mer による刺激. 回文配列を持つオリゴ DNA により二つの FL が連結され, その FL が抗体-受容体キメラにある ScFv と結合することにより抗体-受容体キメラダイマーを誘導できる. ④, Anti-HA 抗体による刺激. 構築した抗体-受容体キメラ N 末端に HA-tag がついている. Anti-HA 抗体がその HA-tag と結合することにより抗体-受容体キメラダイマーを誘導できる. ⑤,

Anti-HA 抗体プラス Anti mouse IgG F(ab')₂ による刺激. Anti-HA 抗体が HA-tag と結合して、さらにその上に Anti mouse IgG F(ab')₂ が Anti-HA 抗体と結合することによりオリゴマーを誘導すると考えられる.

EpoR シグナル伝達経路中で重要なシグナル伝達蛋白質として JAK2, STAT5 と ERK1/2 が挙げられる. 複数のリガンドによる刺激後、それらの蛋白質のリン酸化の度合いを Western Blotting により評価した. Fig. 4-23 が JAK2, Fig. 4-24 が STAT5, Fig. 4-25 が ERK1/2 のリン酸化の Western Blotting 結果を示した. Fig. 4-26~28 では規格化を行った後でプロットしたグラフである. ERK1 のリン酸化状況は ERK2 とはほぼ同じであったため ERK2 のみを計算した.

結果を解析すると、①、多くのケースで JAK2, STAT5 と ERK2 のリン酸化レベルは細胞内ドメインコンホメーション変化角度が 0°, 220° と 440° になったところにピークを示す傾向があった. リン酸化レベルは Ala 残基一つの挿入により減少し, Ala 残基二つ挿入された後で回復し, Ala 残基を三つ挿入すると、リン酸化レベルはまた減少し, 4 個挿入するとまた回復した. その結果から見れば、細胞内ドメインコンホメーションがシグナル伝達に大きな影響を与えていることが分かった. ②、それぞれの抗体-受容体キメラで違うリガンド刺激により違う刺激効果を表した. 例えば、SD1D2e-4A における JAK2 リン酸化レベルはリガンドにより大きな差が出た. そのほかの抗体-受容体キメラにおいても同じような現象が見られた. Ala 残基の挿入によりリガンド応答性も変わることが分かった. 例えば、SD1D2e-4A における JAK2 リン酸化レベルは BSA-FL において一番高く、続いて Epo, Anti-HA 抗体, Anti-HA 抗体プラス Anti-Mouse IgG 抗体, FL Dimer-13 とリガンドなしであった. それに対して、SD1D2e-2A における JAK2 リン酸化レベルは Anti-HA 抗体による刺激において一番高く、続いて Anti-HA 抗体プラス Anti-Mouse IgG 抗体, Epo, BSA-FL, FL Dimer-13 とリガンドなしであった. 細胞内ドメインの配向性だけではなく、細胞外ドメインの差によりリガンド応答性も変わることが分かった. 例えば、SD1D2e-2A における STAT5 リン酸化レベルは Epo において一番高く、続いて BSA-FL, Anti-HA 抗体, Anti-HA 抗体プラス Anti-Mouse IgG 抗体, FL Dimer-13 とリガンドなしであった. それに対して、同じ細胞内ドメインの持つ SD2e-2A における STAT5 リン酸化レベルは Anti-HA 抗体による刺激が一番高く、続いて BSA-FL, Epo, リガンドなし, Anti-HA 抗体プラス Anti-Mouse IgG 抗体と FL Dimer-13 であった.

同じ抗体-受容体キメラにおいても、シグナル伝達蛋白質によって最適な刺激リガンドは違うことが分かった. 例えば、SD1D2e-2A における STAT5 リン酸化レベルは Epo による刺激において一番高く、続いて BSA-FL, Anti-HA 抗体, Anti-HA 抗体プラス Anti-Mouse IgG 抗体, FL Dimer-13 とリガンドなしであった. それに対して、ERK2 リン酸化レベルは Anti-HA 抗体プラス Anti-Mouse IgG 抗体による刺激において一番高く、続いて Epo, BSA-FL, FL Dimer-13 または Anti-HA 抗体, 一番低いのはリガンドなしであった.

4.4. 考察

EpoR 細胞外ドメインの構造または細胞内ドメインの配向性の抗体-受容体キメラシグナル伝達に対する影響を調べるために、本研究では N 末端に HA-tag のついた ScFv を融合した抗体-受容体キメラシリーズを構築した。細胞外ドメインとしては D1D2 共にある抗体-受容体キメラ (D1D2 抗体-受容体キメラ), D1 または D2 のみを細胞外ドメインとして持つ抗体-受容体キメラ (D1 抗体-受容体キメラと D2 抗体-受容体キメラ), または細胞外 D1D2 ドメイン共にない抗体-受容体キメラを構築した。細胞内ドメインの配向性の影響を調べるために、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を一つから四つまで挿入することにより細胞内ドメインの配向性を変化させた。

構築した抗体-受容体キメラの BaF3 細胞での発現は Western Blotting により確認できた。抗体-受容体キメラの細胞表面での発現は、N 末端に HA-tag がついており、一次抗体として Anti-HA と、PE 標識した二次抗体を用いて確認できた。Ala 残基挿入により表面発現量が大きく影響されることはないことが分かった。一方、細胞外ドメインの差により表面発現量が大きく変わった。細胞外ドメインにより抗体-受容体キメラの細胞表面での発現量に大きく影響を与えていることが分かった (Fig. 4-18)。以前の研究報告によると、新しく翻訳された EpoR の数割しか細胞表面に発現できず、そのほかは小胞体で分解されてしまった。細胞外ドメインの構造が抗体-受容体キメラの細胞表面の発現量に関与することは、抗体-受容体キメラの安定性に大きく影響を与えていることを示唆している。Fig. 4-18 に示したように、D1D2 抗体-受容体キメラの表面発現量は D1 抗体-受容体キメラまたは D2 抗体-受容体キメラより高く、D1 抗体-受容体キメラの表面発現量は一番低いことが分かった。その結果から見れば、細胞外ドメインは表面発現量に直接に関与していることが分かった。EpoR 細胞外ドメインの保存配列 Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (WSXWS), モチーフまたは同等なモチーフはレセプターのフォルディングまたは膜表面への運送に大きな役割を果たしていることがすでに報告された(117-120)。EpoR の WSAWS モチーフに Mutation A234E を導入して、WSAWS モチーフによりレセプターの表面発現効率をもっと有効になることが分かった。WSEWS モチーフは EpoR 細胞外 D2 ドメインにあり、D1 抗体-受容体キメラでは WSAWS モチーフが欠如していることから翻訳された抗体-受容体キメラが不安定になり、細胞表面での発現量も減少したと考えられる。

構築した抗体-受容体キメラの抗原依存性細胞増殖では、BSA-FL が D1D2 抗体-受容体キメラにおいては Agonist, D2 抗体-受容体キメラにおいては Inverse Agonist, D1 抗体-受容体キメラには影響を及ぼさなかった。細胞外ドメインは抗原応答性に大きな影響を与えていることが示唆された。

刺激実験では、BSA-FL, Epo, FL dimer 13, mouse anti-HA, anti-mouse IgG をリガンドとして、抗体-受容体キメラのそれぞれの部位に結合させてシグナル伝達を誘導した。その結果、同じリガンドのそれぞれの抗体-受容体キメラにおける刺激効果は大きく異なったことから、抗体-受容体キメラ細胞外ドメインは抗体-受容体キメラの活性に

大きな影響を持つことが示唆された。

Constantinescu et al.(6)の研究結果を参考にして、細胞内ドメインの配向性を変えるために、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を挿入した。抗体-受容体キメラの BSA-FL に対する増殖応答性は Ala 残基の挿入により大きく変わった。例えば、SD1D2e 抗体-受容体キメラの BSA-FL に対する応答性は Ala 残基 1~3 個の挿入により大きく減少したが、四つの Ala 残基の挿入により大きく回復した。D2 キメラと D1 キメラでも、Ala 残基の挿入によって抗原応答性細胞増殖が大きく影響された。以上の結果から細胞内ドメインの配向性は抗体-受容体キメラの活性に大きな影響を持つことが示唆された。

本研究で構築した抗体-受容体キメラのそれぞれの部位に結合することにより、抗体-受容体キメラダイマーまたはオリゴマーを誘導して、シグナル伝達経路における蛋白質のリン酸化を調べることによりシグナル伝達メカニズムを解明する手法は、本研究で初めて提唱したものである。この手法を用いれば受容体の活性化機構の解明などの研究に新しい知見を与えられと考えられる。

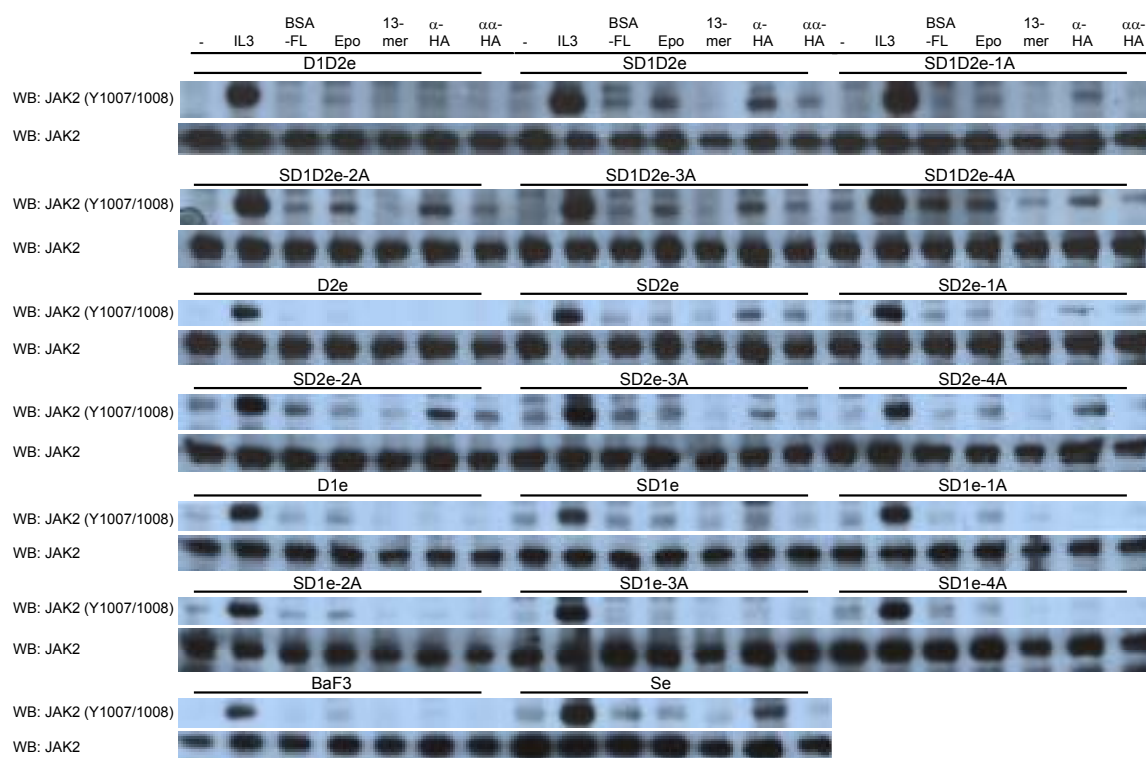


Fig. 4-23 JAK2 のリン酸化状況

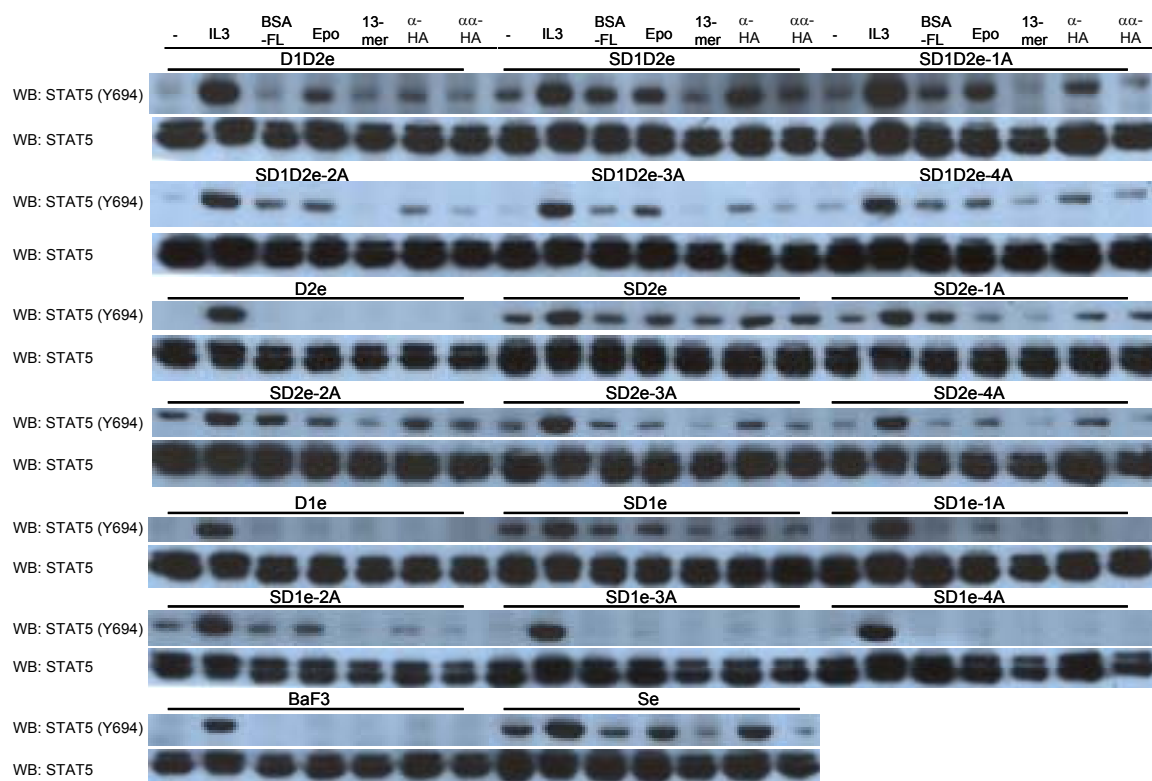


Fig. 4-24 STAT5 のリン酸化状況

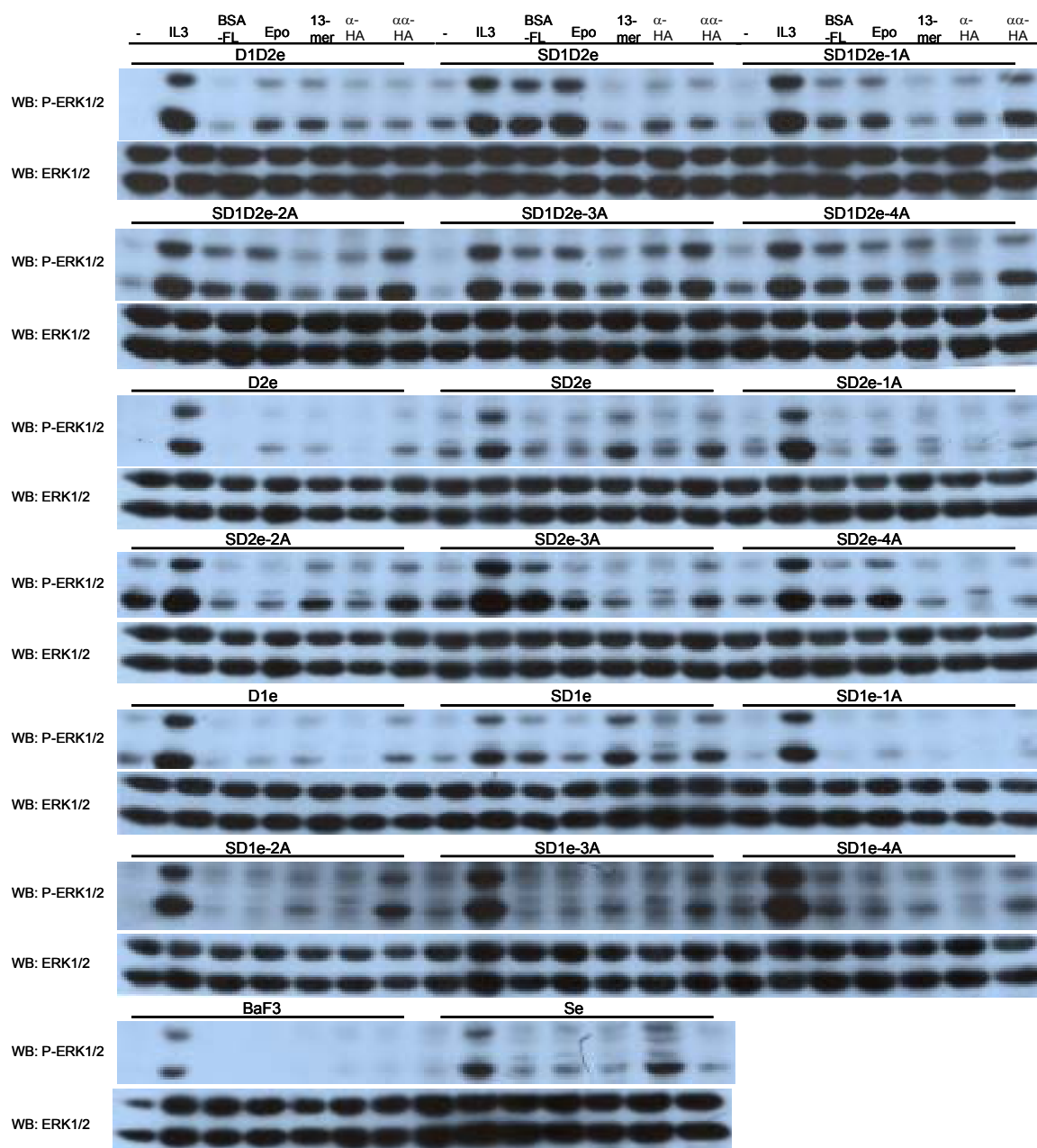
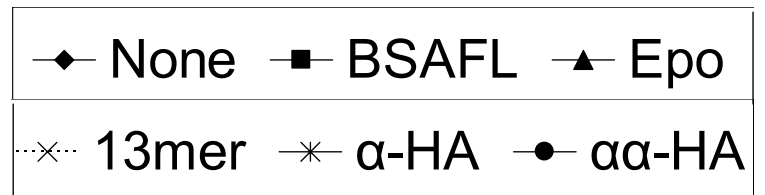


Fig. 4-25 ERK1/2 のリン酸化状況



P-JAK2

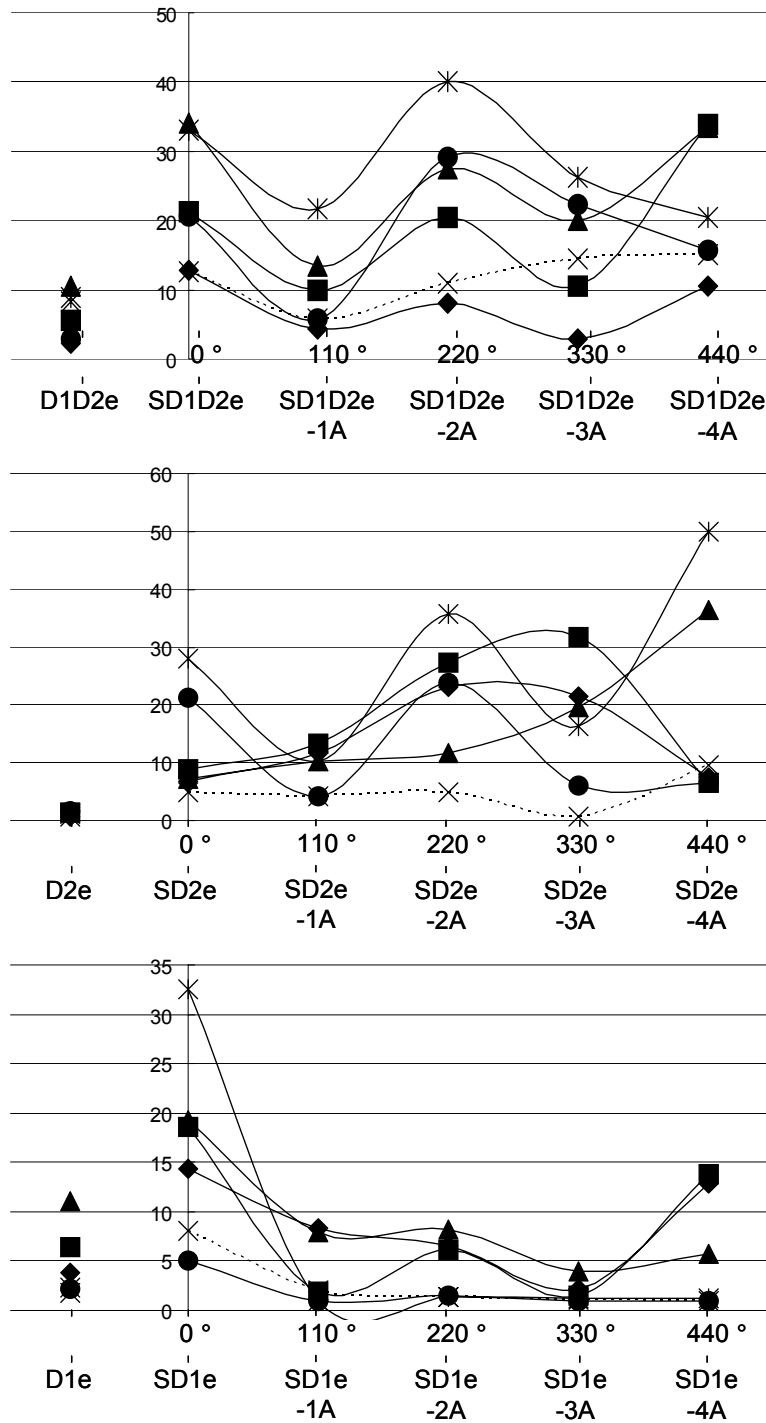


Fig. 4-26 規格化した JAK2 のリン酸化状況

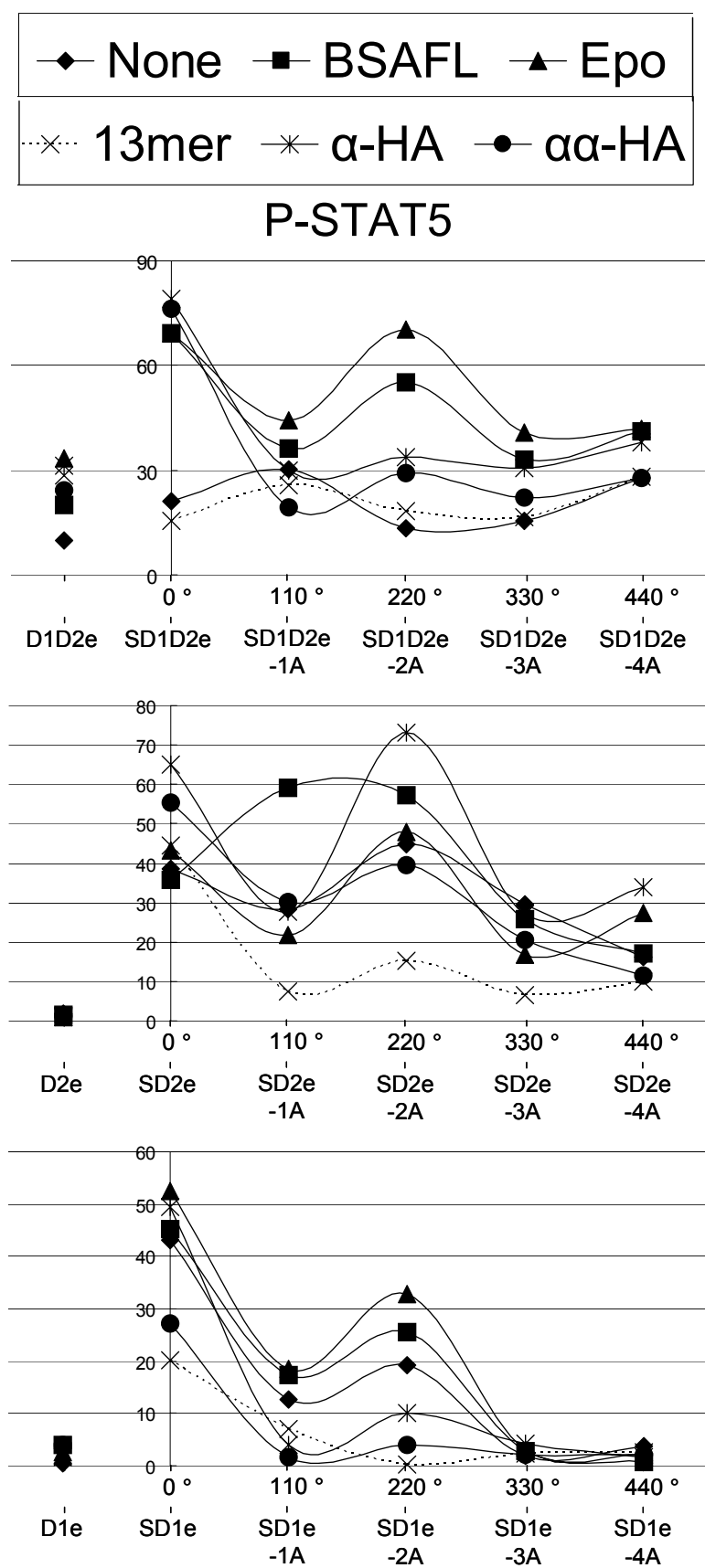
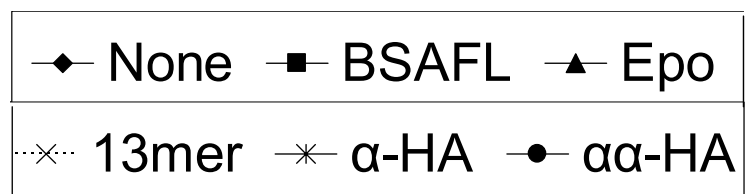


Fig. 4-27 規格化した STAT5 のリン酸化状況



P-ERK2

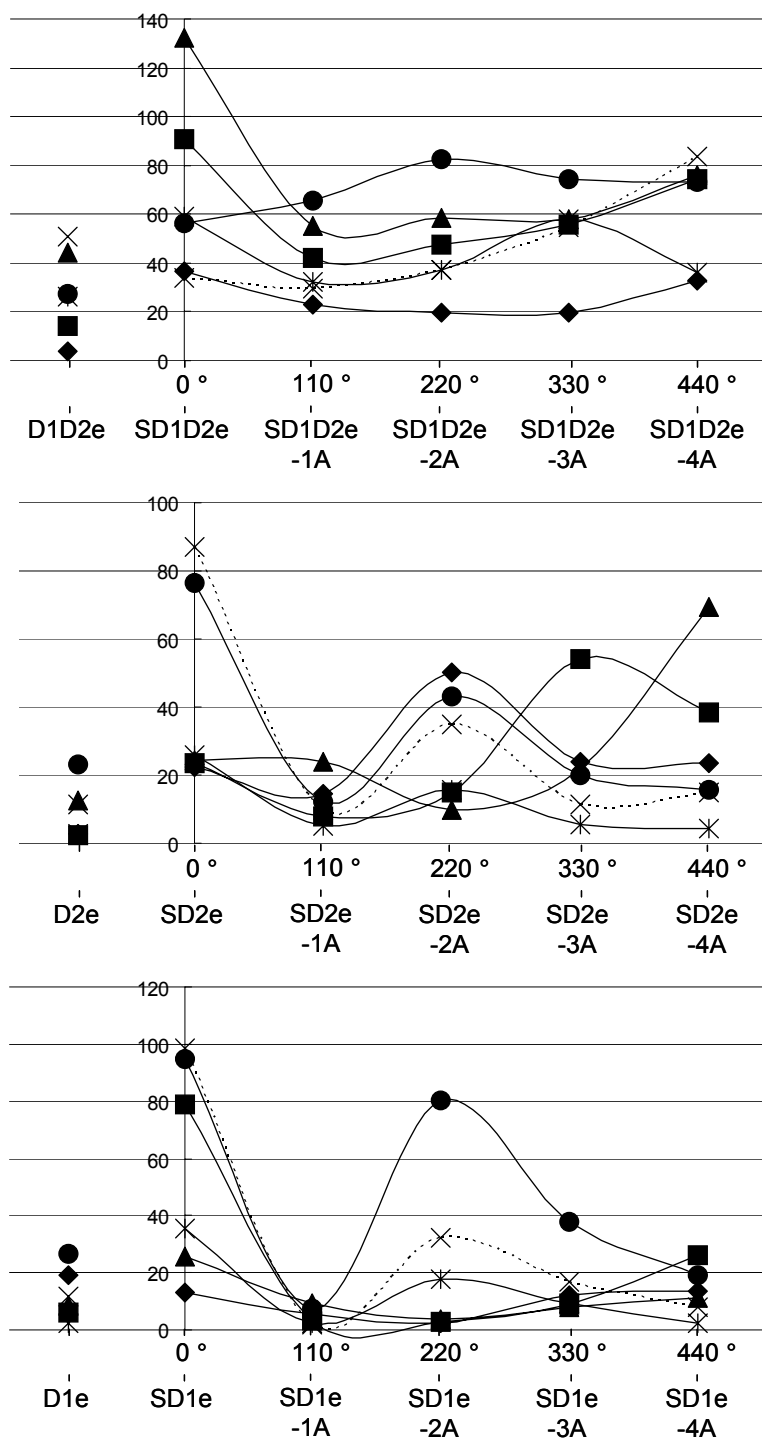


Fig. 4-28 規格化した ERK2 のリン酸化状況

5. 厳密にリガンド依存性を持つフルオレセイン応答性抗体-受容体キメラの構築

5.1. 序論

4 章では、抗体-EpoR キメラの細胞外ドメイン及び細胞内ドメインの配向性がシグナル伝達に与える影響を研究した(121). EpoR 細胞外ドメインとして D1 ドメインのみ、D2 ドメインのみ、または D1 と D2 両方を持つ抗体-受容体キメラを構築し、さらに細胞内ドメイン配向性の抗体-受容体キメラ活性に対する影響を調べるために、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を一つから四つまで挿入した抗体-受容体キメラを構築した. 抗原である BSA-FL に対する増殖依存性を評価したが、細胞増殖 ON/OFF 制御のできる抗体-受容体キメラが見つからなかった (Fig. 4-19). 構築した抗体-受容体キメラでは BSA-FL に対する応答性がないか、またはリガンド非依存性細胞増殖が見られた. リガンド非依存性細胞増殖のある抗体-受容体キメラを発現した細胞は *in vivo* ではガンとなるため医療での応用は難しい.

以前の研究で構築した抗体-受容体キメラ NoHA-SD2e, NoHA-SD2em, NoHA-SD2g と NoHA-SD2gm (Fig. 4-1)の抗原依存性細胞増殖に関して、EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラ NoHA-SD2e と NoHA-SD2em はリガンド非依存性細胞増殖を示した. そこで細胞内ドメインを EpoR 細胞内ドメインから gp130 細胞内ドメインに置換した抗体-受容体キメラ NoHA-SD2g と NoHA-SD2gm ではリガンド応答性がなくなり、細胞は死滅してしまった. 以上の結果から、抗体-受容体キメラ中にある細胞内ドメインのシグナル伝達能力に関して、EpoR 細胞内ドメインは gp130 細胞内ドメインより高いことが示唆された. 抗体-受容体キメラ細胞内ドメインを EpoR 細胞内ドメインから gp130 細胞内ドメインに置換することにより、リガンド非依存性細胞増殖能力を低下させる可能性が示唆された. 本研究で構築した EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラの中でリガンド非依存性細胞増殖を示した抗体-受容体キメラもあった. 細胞内ドメインの置換によりリガンド非依存性細胞増殖能力を低減させることにより、リガンド依存性細胞増殖を厳密に ON/OFF 制御のできる抗体-受容体キメラを構築できる可能性が考えられた. そこで、構築した EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラ (Fig. 4-13) の細胞内ドメインを EpoR 細胞内ドメインから gp130 細胞内ドメインに置換した抗体-受容体キメラを構築した. 新しく構築した抗体-受容体キメラの BSA-FL に対する細胞増殖応答性を growth assay で評価した. 作製した抗体-受容体キメラの中で、細胞外ドメインが ScFv のみであり、EpoR 膜貫通ドメインと細胞内ドメインとして gp130 細胞内ドメインを有する抗体-受容体キメラ Sg は BSA-FL の有無による細胞増殖シグナルの ON/OFF が最も明確となることが分かった.

5.2. 実験方法

5.2.1. ベクター構築

Fig. 4-13 に示した EpoR をベースにした抗体-受容体キメラシリーズの EpoR 細胞内ドメインを gp130 細胞内ドメインに置換して、新しい抗体-受容体キメラを構築した。

1. 抗体-受容体キメラD1D2e, D1eとD2eを*Bam*HIと*Bsi*WIで処理した後、同じ制限酵素で処理したNoHA-SD2gに組み込ませてD1D2g, D1gとD2gベクターを構築した (Fig. 5-1)。SD1D2g, SD1g, SD2gとSgベクターを構築した (Fig. 5-2)。
2. Fig. 5-3~5, NoHA-SD2gベクターをテンプレートにして、Primer (1A gp130 For: 5'-GGG CGT ACG GCT AAT AAG CGA GAC CTA ATTA -3', 2A gp130 For: 5'-GGG CGT ACG GCT GCC AAT AAG CGA GAC CTA ATTA -3', 3A gp130 For: 5'-GGG CGT ACG GCT GCC GCA AAT AAG CGA GAC CTA ATTA -3', 4A gp130 For: 5'-GGG CGT ACG GCT GCC GCA GCG AAT AAG CGA GAC CTA ATTA -3' and A gp130 Rev: 5'-CGT TAG GGG GGG GGG AGG GAG AGG GGC GGA TCC ATCG -3') により、gp130膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間にAla残基を一つから四つまで挿入した。増幅させた断片を*Bsi*WIと*Bam*HIの処理により切り出し、同じ制限酵素で処理したSD1D2g (SD2g; SD1g)に組み込ませてSD1D2g-1A ~ SD1D2g-4A (SD2g-1A ~ SD2g-4A; SD1g-1A ~ SD1g-4A)ベクターを構築した。抗体-受容体キメラ遺伝子はIRESによりEGFPと共発現できような構造になっている。EGFPはマーカー蛋白質として用い、FACS測定により遺伝子導入率などの測定ができる。

5.2.2. 細胞の培養

BaF3細胞培養に関しては4.2.4と同じである。Plat-E細胞培養に関しては4.2.5と同じである。

5.2.3. トロウィルスによる細胞への遺伝子導入, フローサイトメーターによる遺伝子導入効率の確認

レトロウィルスを利用して構築したベクターをBa/F3細胞に導入した。具体的な操作は4.2.6に説明した。

得られた細胞をPBSで一度洗浄した後、Isoflow (Beckman Coulter, Fullerton, CA)に再懸濁し、FACS Calibur (Beckton Dickson)を用いて測定を行った。

5.2.4. Growth Assayと抗原特異性Growth Assay

具体的な操作は4.2.16を参考にして行った。

5.2.5. 刺激実験

抗体-受容体キメラのシグナル伝達に対する影響を調べるために刺激実験を行った。EGFP陽性の細胞をPBS Washにより培地中のIL-3を洗浄してから12時間 depletionさせ

た．その後は67 pM IL-3, 76 nM BSA-FLを使って15Min刺激した．その後はサンプルを氷上に移して，2 mM Na₃VO₅を添加してから細胞を遠心により集めた．細胞ライセートを取ってWestern Blottingにより蛋白質リン酸化状況を調べた．

5.2.6. Western blottingによる抗体-受容体キメラの発現確認

具体的な操作は4.2.14を参考にして行った．一次抗体としてanti-mouse gp130 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-mouse AKT (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), rabbit anti-ERK 1/2(Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-mouse STAT3 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Phospho-Ser473-AKT (Cell Signaling Technology), rabbit antiphospho-p42/44 MAPK (an anti-ACTIVE MAPKpAb; Promega, Madison, WI, USA) or rabbit anti-Phospho-Tyr705-Stat3 (Cell Signaling Technology)を使用した．二次抗体は HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Biosource, Camarillo, CA)を使用した．

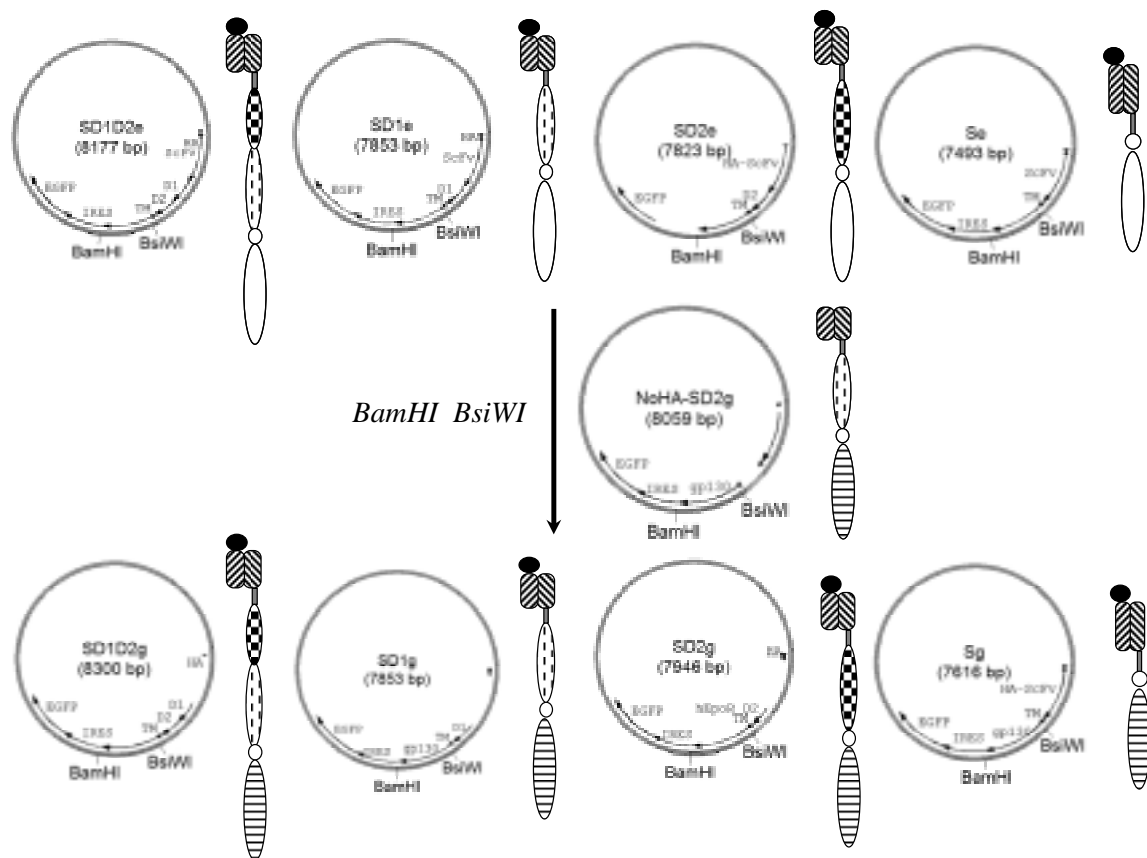


Fig. 5-2 抗体-受容体キメラ SD1D2g, SD1g, SD2g と Sg の構築

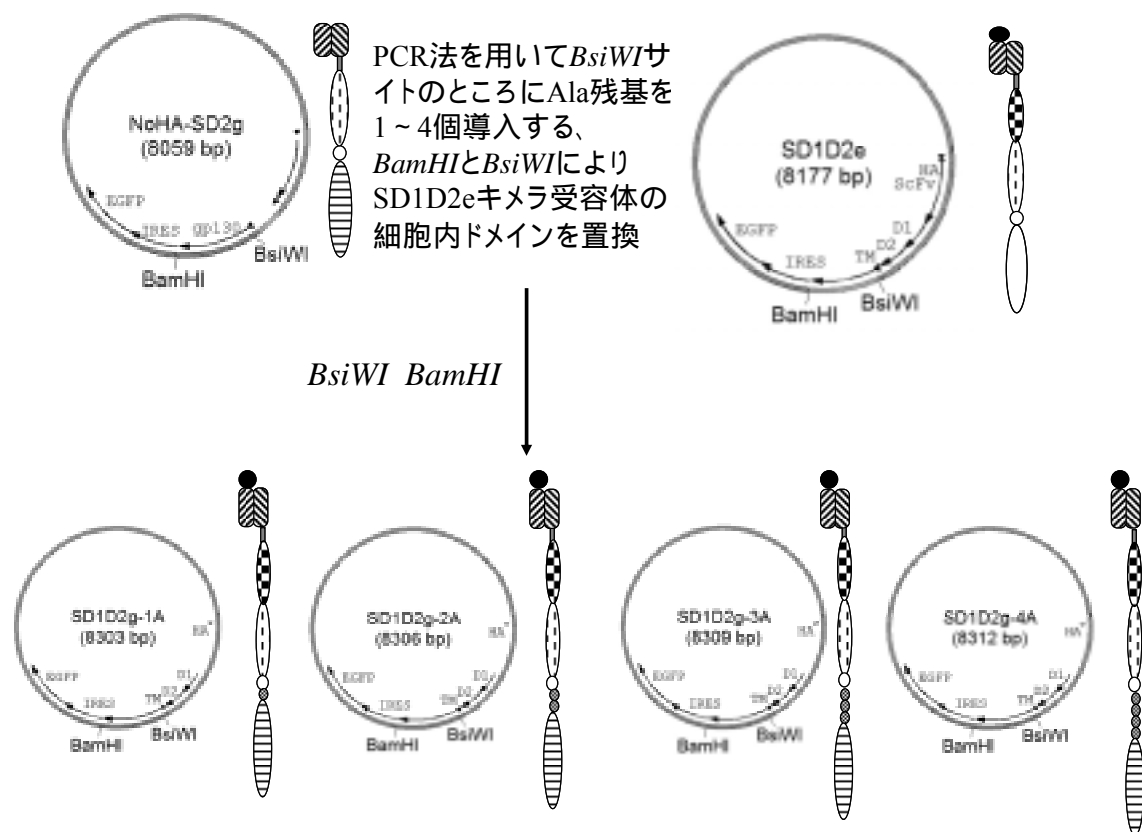


Fig. 5-3 抗体-受容体キメラ SD1D2g-1A～SD1D2g-4A の構築

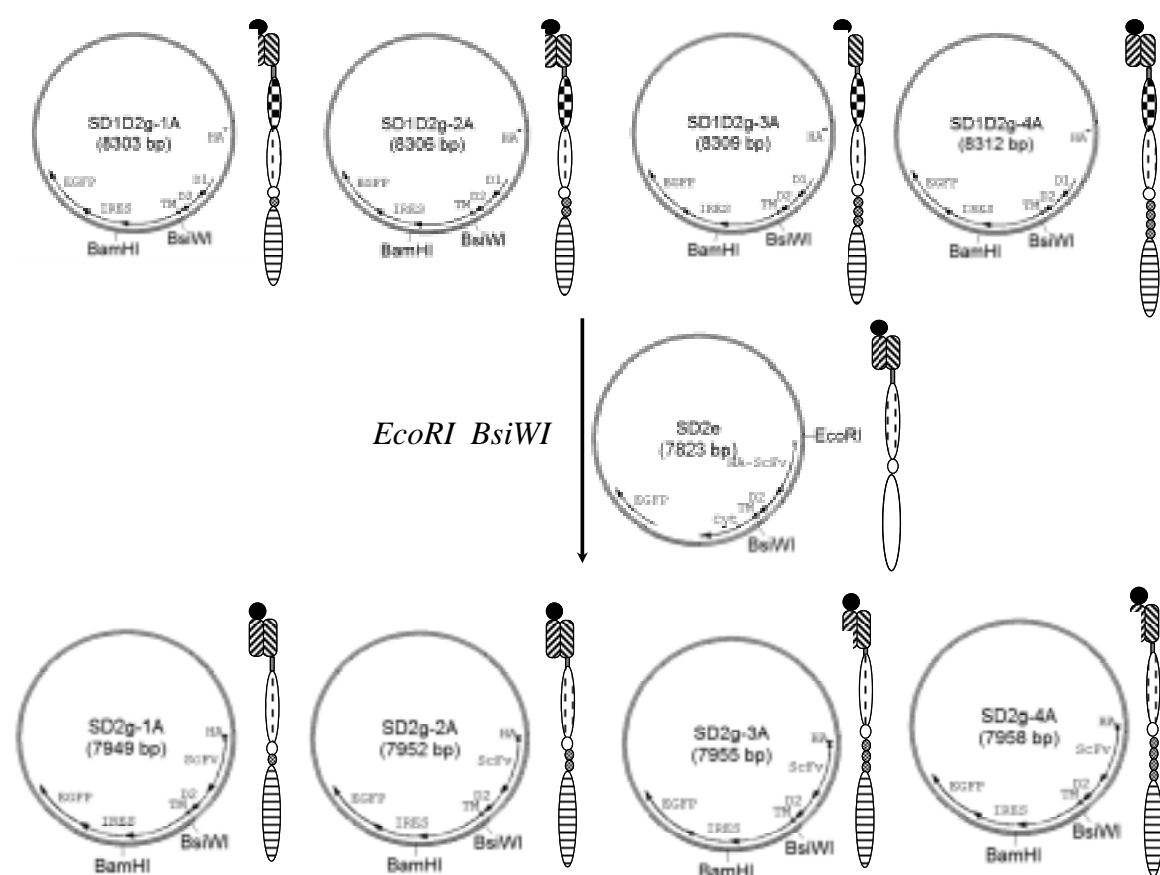


Fig. 5-4 抗体-受容体キメラ SD2g-1A～SD2g-4A の構築

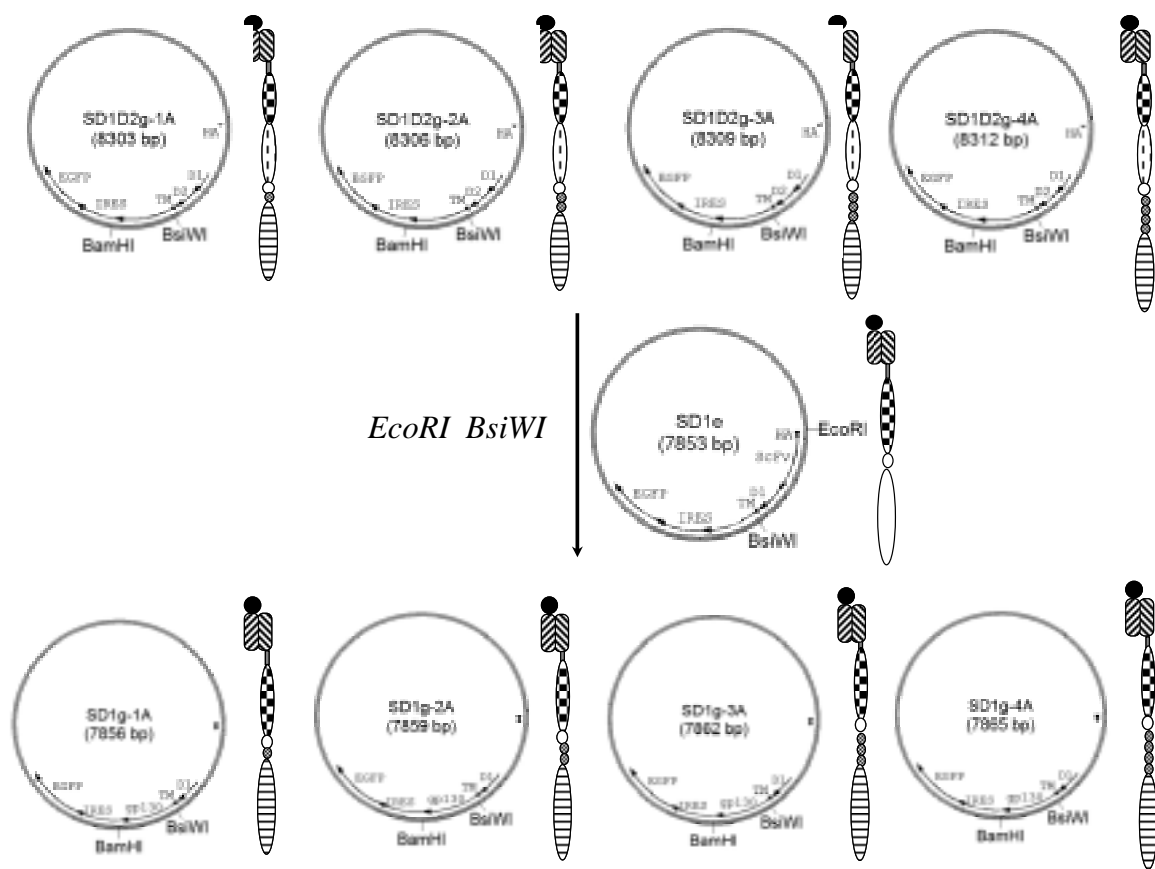


Fig. 5-5 抗体-受容体キメラ SD1g-1A～SD1g-4A の構築

5.3. 実験結果

5.3.1. 抗体-受容体キメラベクター構築

細胞増殖の ON/OFF を厳密に制御できる抗体-受容体キメラを構築するために、これまで構築した抗体-受容体キメラ(121)(Fig. 4-13) の細胞内ドメインを EpoR 細胞内ドメインから gp130 細胞内ドメインに置換した抗体-受容体キメラを構築した (Fig. 5-6A) .

最初に ScFv を直接に細胞外 D1D2 ドメインに融合した抗体-受容体キメラ SD1D2g を構築した. EpoR 細胞外ドメインのシグナル伝達に対する影響を調べるために、D1 ドメインまたは D2 ドメインを削除した抗体-受容体キメラ SD2g と SD1g を構築した. さらに、細胞外 D1D2 ドメインを全部削除して、ScFv を直接に膜貫通ドメインに融合した抗体-受容体キメラ Sg を構築した. 構築した抗体-受容体キメラ SD1D2g, SD2g と SD1g をベースにして、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を一つから四つまで挿入して、抗体-受容体キメラ SD1D2g-1A ~ SD1D2g-4A, SD2g-1A ~ SD2g-4A と SD1g-1A ~ SD1g-4A を構築した. 検出に使うために構築した抗体-受容体キメラの N 末端に HA-tag を付加した. 構築した抗体-受容体キメラの遺伝子構造は Fig. 5-6B に示した. 抗体-受容体キメラ遺伝子と EGFP 遺伝子を IRES により共発現させることができ、EGFP はマーカー蛋白質として遺伝子導入率などの測定に使った.

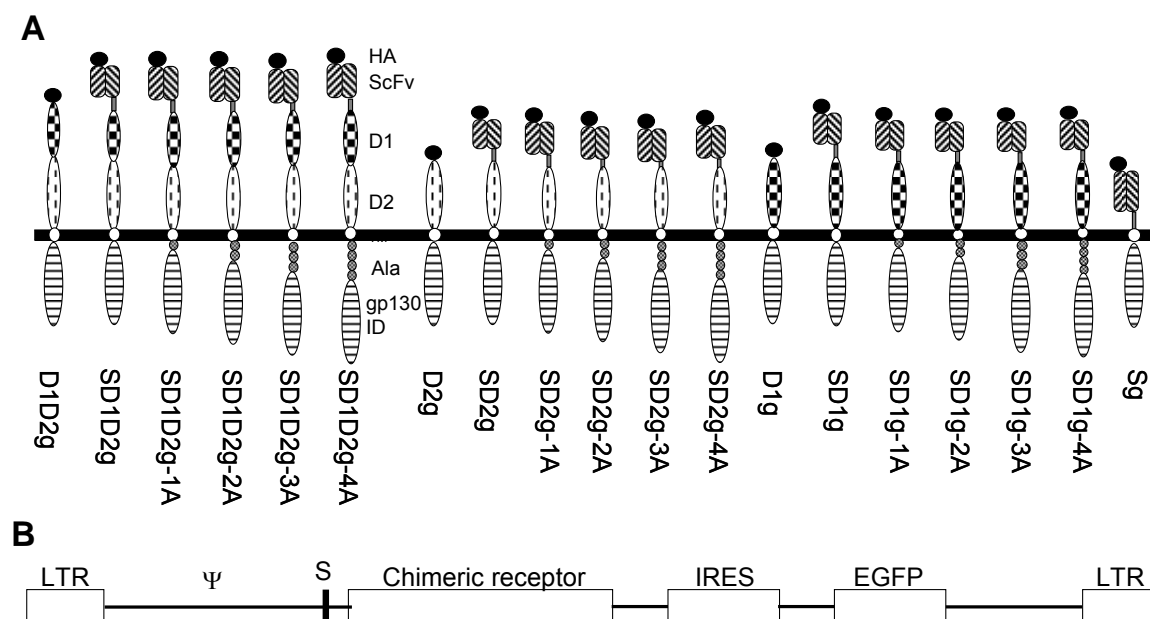


Fig. 5-6 A : 構築した gp130 細胞内ドメインの持つ抗体-受容体キメラ. B : 抗体-受容体キメラ遺伝子は IRES により EGFP と共発現できるような構造になっている

5.3.2. 抗体-受容体キメラの BaF3 細胞での発現確認

抗体-受容体キメラ D1D2g (55.6 KDa), SD1D2g (81.1 KDa), SD1D2g-1A ~ SD1D2g-4A (81.1 KDa), D2g (42.8 KDa), SD2g (68.1 KDa), SD2g-1A ~ SD2g-4A (68.1 KDa), D1g (54.0 KDa), SD1g (69.3 KDa), SD1g-1A ~ SD1g-4A (69.3 KDa), Sg (56.3 KDa)を遺伝子導入し

た BaF3 細胞を Selection 後, EGFP 陽性の細胞からライセートを取って, Western Blotting により抗体-受容体キメラの発現を確認した (Fig. 5-7). その結果, すべての抗体-受容体キメラの細胞での発現が確認できた. それぞれの抗体-受容体キメラの細胞での発現量の差があった. D1 キメラの発現量は D1D2 キメラと D2 キメラのより高いことが分かった. 抗体-受容体キメラは細胞内に翻訳され, いろいろな修飾を受けてから細胞表面に発現される. そこで添加された抗原と相互作用してダイマーまたはオリゴマー化し細胞増殖分化などのシグナルを伝達するようになる. 従って, 抗体-受容体キメラの細胞表面での発現レベルが抗原応答性細胞増殖に大きな影響を持つと予測される. また, Wild-type EpoR に関しては, 報告によると細胞内で翻訳された EpoR の数割しか細胞表面に発現されないため, 細胞での全発現量が高い場合に細胞表面での発現レベルも高いとは限らない.

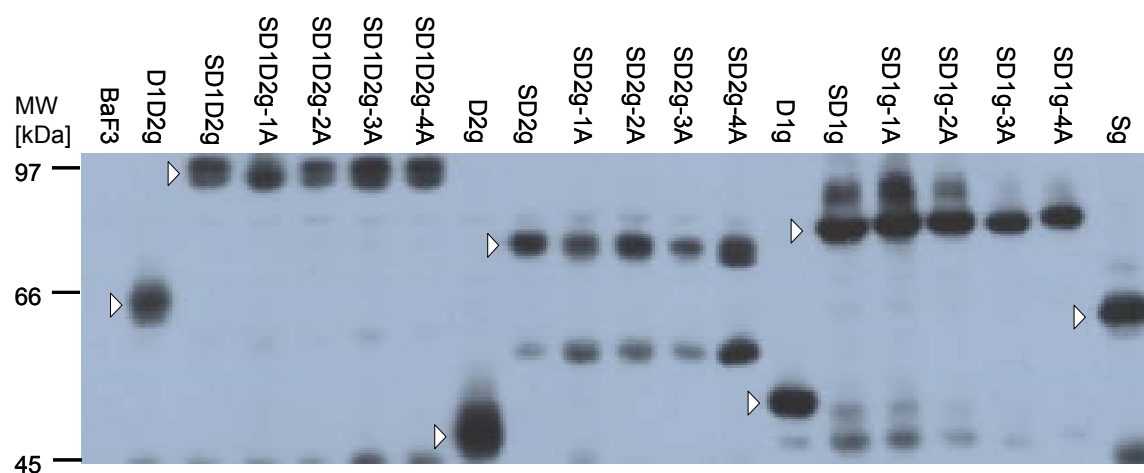


Fig. 5-7 抗体-受容体キメラ細胞での発現の Western Blotting 確認結果

5.3.3. 抗体-受容体キメラの BaF3 細胞表面での発現確認

構築した抗体-受容体キメラの N 末端に HA-tag が付加されてあるので, 一次抗体として mouse monoclonal anti-HA (Babco, Richmond, CA), さらに二次抗体として PE-conjugated donkey F(ab')₂ anti-mouse IgG を使って, FACS Calibur flow cytometer で, 励起波長が 488 nm, 蛍光検出波長が 585 ± 21 nm の条件で, 細胞表面での発現レベルを測定した (Fig. 5-8). 白いヒストグラムは HA-tag のついてない抗体-受容体キメラを使って測定した結果であり, ネガティブコントロールとして使った. 黒いヒストグラムが実際各キメラ発現細胞を測定した結果である. M は PE 蛍光強度の中間値 (メディアン) であり, 抗体-受容体キメラの細胞表面での発現量の指標として用いた.

細胞外ドメインにより三つのグループに分けて, D1D2 抗体-受容体キメラ: D1D2 ドメインの持つ抗体-受容体キメラ, D1D2g, SD1D2g, SD1D2g-1A ~ SD1D2g-4A.

D1 抗体-受容体キメラ: D1 ドメインのみ持つ抗体-受容体キメラ, D1g, SD1g, SD1g-1A ~ SD1g-4A.

D2 抗体-受容体キメラ: D2 ドメインのみ持つ抗体-受容体キメラ, D2g, SD2g,

SD2g-1A ~ SD2g-4A. すべての抗体-受容体キメラの BaF3 細胞表面での発現が確認できた. しかし表面発現量を示すメディアン値分布は 9 (SD1g-3A)から 245 (Sg)まで幅広かった. 構築した EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラでは D1D2 抗体-受容体キメラが D2 キメラと D1 キメラより高く, D1 キメラがもっとも低いことが分かった (Fig. 4-17)(121). Gp130 細胞内ドメインに置換したそれぞれの抗体-受容体キメラグループの表面発現量の平均値を計算して比較した. D1D2 キメラ (M Average=62) と D2 キメラ (M Average=76) はほぼ同じであり, D1 キメラ (M Average=16) のより高いことが分かった. D2 ドメインの抗体-受容体キメラ安定性に関与していることが示唆された.

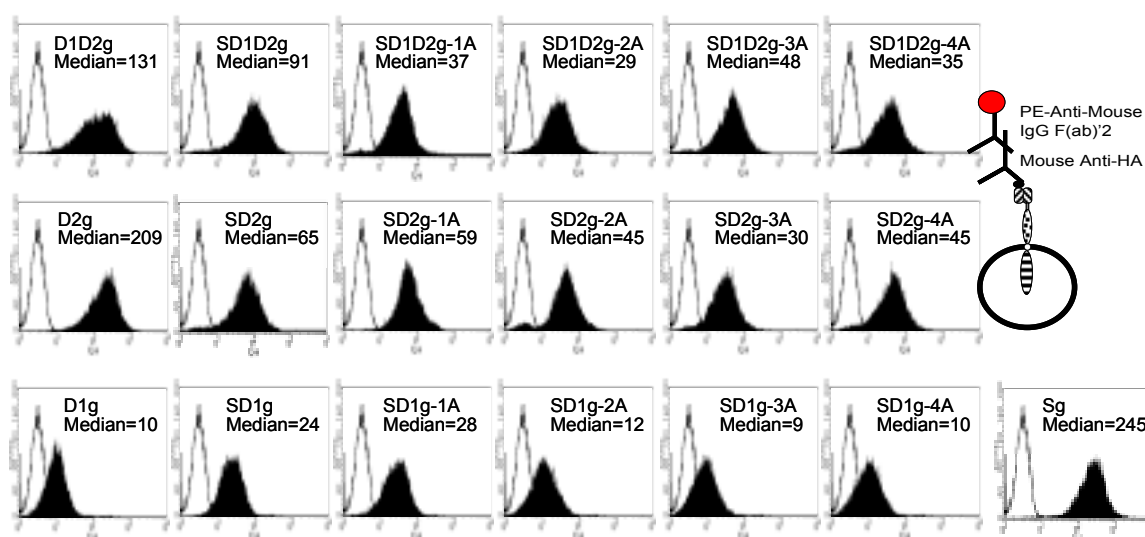


Fig. 5-8 抗体-受容体キメラの細胞表面での発現を測定した結果

5.3.4. BSA-FL に対する抗原依存性増殖

抗体-受容体キメラを発現した BaF3 細胞の抗原 BSA-FL に対する増殖依存性を評価するために, Growth Assay を行った. 抗原 BSA-FL は BSA の上に FL を修飾したもので, 抗体-受容体キメラに融合した ScFv 31IJ3 Clone 部分と結合でき, 抗体-受容体キメラのダイマーまたはオリゴマーを誘導してシグナル伝達経路を活性化し, 細胞増殖を誘導すると考えられる. 抗体-受容体キメラ構造はシグナル伝達に大きく影響を与えていると考えている. BSA-FL を用いた Growth Assay により EpoR 細胞外ドメインまたは細胞内ドメイン配向性変化のシグナル伝達に対する影響を考察できる.

抗体-受容体キメラを発現した BaF3 細胞を PBS で三回 Wash することにより, 培地中の IL-3 を除去してから, 96-well plate に 2000 cells /100 μ l /well を加えて, 各濃度の BSA-FL を添加してから三日間培養後, Cell Counting Kit-8 (Dojindo Japan)試薬を使って細胞数を数えた. 結果は Fig. 5-9 に示した.

ScFv が融合されていない抗体-受容体キメラをネガティブコントロールとして使った. その結果は予想通りに, D1D2g, D2g と D1g は BSA-FL に対する細胞増殖応答

性はなかった。

EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラでは、細胞外ドメインにより、BSA-FL は Agonist, Inverse Agonist または応答性なしとなり、働き方が異なったが、細胞内ドメインを gp130 に置換した抗体-受容体キメラでは BSA-FL が Agonist として働いた。細胞内ドメインの差により、BSA-FL の働き方までが変わった。細胞内ドメインの違いによりシグナル伝達メカニズムが大きく変わることが示唆された。

Gp130 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラでは、SD1D2g が BSA-FL の添加に応答して細胞増殖したが、その応答性が Ala 残基二つから四つの挿入によって大きく阻害され、抗体-受容体キメラ SD1D2g-2A ~ SD1D2g-4A では殆ど応答性がなくなってしまった。

一方、EpoR 細胞外ドメイン D2 のみの抗体-受容体キメラ SD2g の BSA-FL に対する応答性がなかったが、Ala 残基を一つまたは二つ挿入すると、BSA-FL 濃度依存性細胞増殖が見られた。さらに Ala 残基を三つまたは四つ挿入すると、その応答性がなくなってしまった。

EpoR 細胞外ドメイン D1 のみの抗体-受容体キメラでは BSA-FL に対する応答性はなかった。細胞外ドメインが D1 のみの場合では、細胞外ドメインによりダイマーまたはオリゴマーになっても、それにより細胞内ドメインコンホメーションの活性化状態での変化は起こらないことが示唆された。細胞内ドメインの配向性と細胞外ドメインの立体構造の両方が抗体-受容体キメラの活性化に重要であることが分かった。

本研究の最初の目的としては細胞増殖の厳密な ON/OFF 制御のできる抗体-受容体キメラの構築である。今回構築した抗体-受容体キメラの中で SD1D2g-1A は抗原依存性細胞増殖 ON/OFF 制御ができたように見えたが、実際の実験では、顕微鏡で観察したところ数個の細胞が残存していることが分かった。その残存した数個の細胞をリガンドなしの条件のままで培養すると細胞が増殖したから、この抗体-受容体キメラによる細胞増殖 ON/OFF 制御は厳密にはできなかった。EpoR 細胞外ドメイン D1D2 を共に削除され、ScFv が直接に膜貫通ドメインに融合した抗体-受容体キメラ Sg では BSA-FL に対して、厳密にリガンド依存性の細胞増殖の ON/OFF 制御ができた (Fig. 5-10)。そのほかに、ScFv が直接に Wild-type EpoR に融合され、細胞内ドメインが gp130 という構造を持つ抗体-受容体キメラ SD1D2g も抗原である BSA-FL に対して、細胞増殖 ON/OFF 制御ができたが、細胞増殖速度は Sg に比べると遅かった。従って、6 章で行ったライブラリー選択には不適切であり、抗体ライブラリー選択には Sg 抗体-受容体キメラを使用することにした。

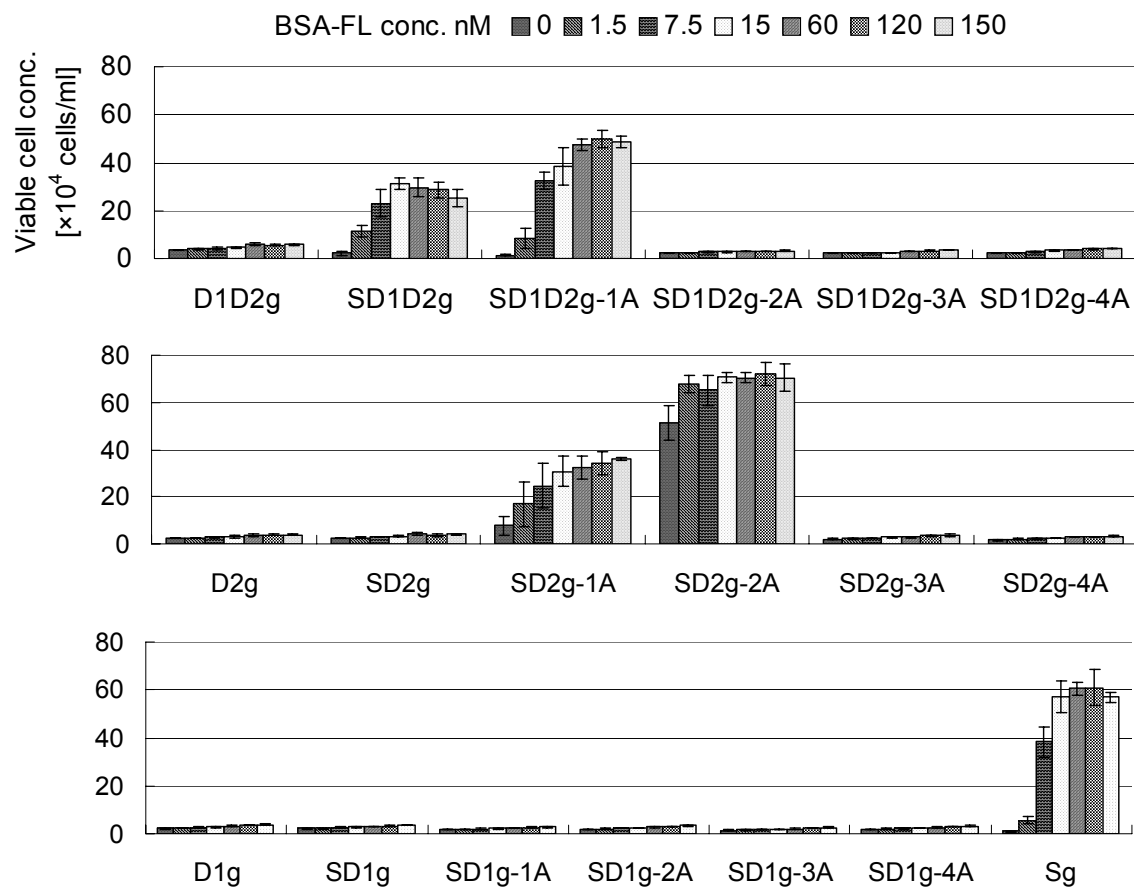


Fig. 5-9 BSA-FL に対する抗原依存性細胞増殖結果

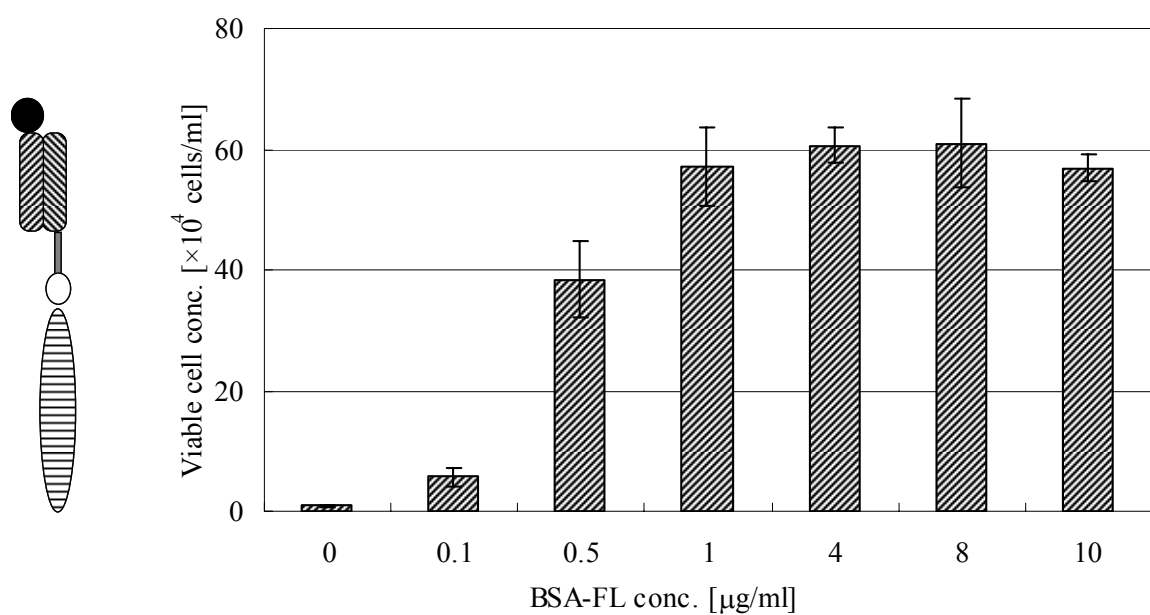


Fig. 5-10 Sg キメラにおける厳密なリガンド依存性細胞増殖 ON/OFF 制御

5.3.5. 表面発現量と抗原応答性の相互関係

受容体のシグナル伝達メカニズムより、受容体の細胞表面での発現量がシグナル伝達に大きな影響を持つと考えられるが、構築した EpoR 細胞内ドメインの持つ抗体-受容体キメラでは、抗体-受容体キメラの細胞表面発現量と抗原応答性増殖の関係をプロットして (Fig. 4-20)、分析したところ、表面発現量にも多少影響はあるが、抗体-受容体キメラ構造の抗原依存性細胞増殖に与える影響が大きいことが分かった。そこで EpoR 細胞内ドメインを gp130 に置換した抗体-受容体キメラでも同じような分析を行った。

構築した gp130 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラの細胞表面での発現量は抗体-受容体キメラの構造によって大きな差があった (Fig. 5-8)。表面発現量の抗原応答性との相互関係を考察するために、構築した抗体-受容体キメラの 60 nM BSA-FL に対する増殖応答を縦軸に、それぞれの抗体-受容体キメラの細胞表面発現量を横軸にしてプロットしたのは Fig. 5-11 である。

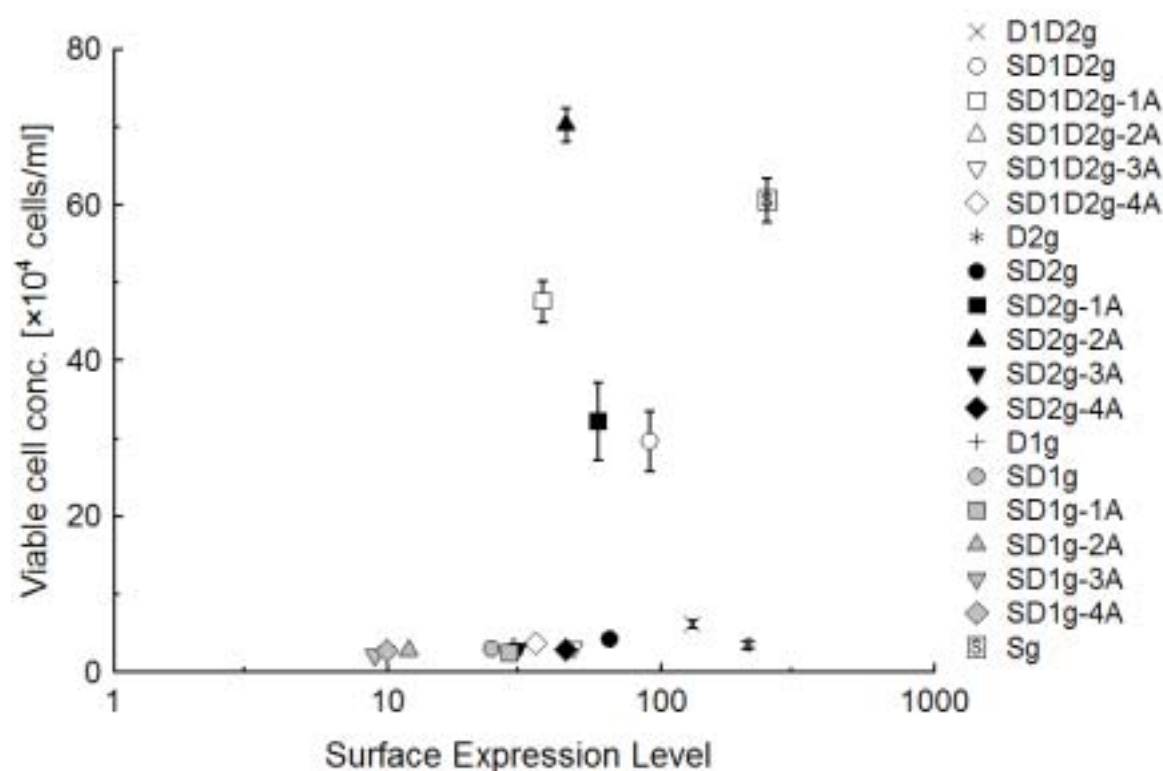


Fig. 5-11 抗体-受容体キメラ細胞表面発現量と抗原依存性細胞増殖応答との関係

BSA-FL に対する抗原依存性増殖が高いのは SD2g-2A であったが、抗体-受容体キメラ SD1D2g, SD2g-1A の表面発現量が SD2g-2A より高かったにも関わらず、抗原依存性細胞増殖応答は SD2g-2A より低かった。またほかにも同じような例もあった。結果から見れば、EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラの分析結果と同じように、細胞増殖の抗原応答性は細胞表面発現量にも多少相関はあるが、抗体-受容体キメラの構造にも大きく影響されることが示唆された。

5.3.6. 抗原特異性

抗体 ScFv 31IJ3 Clone の抗原は FL であり、実験の中ではキャリアー蛋白質として BSA を使用した。キャリアー蛋白質の影響を調べるために、OVA に FL を修飾した OVA-FL を抗原として使用した。そのほかに、フリー状態のキャリアー蛋白質である BSA と OVA の影響を調べるために、それらを使った Growth Assay 実験も行った。BSA または OVA に FL を修飾して、同じ BSA または OVA 分子上に融合した FL 分子は抗体-受容体キメラに融合した ScFv と結合することにより、抗体-受容体キメラダイマーまたはオリゴマーを誘導すると考えられる。そこでフリー状態の FL を添加すると、ダイマーまたはオリゴマーの誘導効果を阻害できると考えられる。それを検証するために、BSA-FL または OVA-FL を添加した培地にフリー状態の FL も添加して、細胞の抗原応答性を評価した。BSA-FL に対する細胞増殖応答性を示した SD1D2g, SD1D2g-1A, SD2g-1A, SD2g-2A, Sg と SD2gg を代表として選んで、Growth Assay を行った。SD2gg 抗体-受容体キメラ(5)の構造は SD2g の膜貫通ドメインを gp130 膜貫通ドメインに置換したものであり、以前の研究報告ではリガンド非依存性増殖バックグラウンドがあることが分かった。結果は Fig. 5-12 に示した。

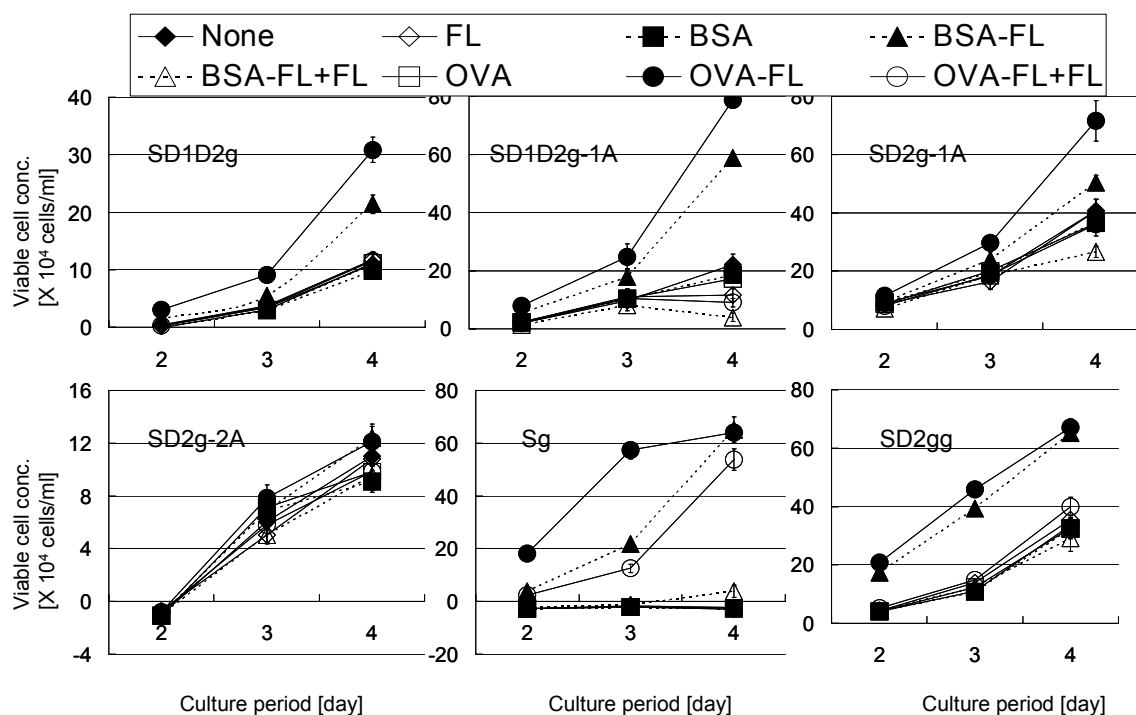


Fig. 5-12 抗体-受容体キメラの細胞増殖の抗原特異性

すべての抗体-受容体キメラは BSA, OVA またはフリー状態の FL に対する応答はなかった。OVA-FL に対する増殖応答性は BSA-FL とほぼ同じであることが分かった。フリー状態 FL を添加した BSA-FL+FL または OVA-FL+FL では、フリー状態の FL により抗体-受容体キメラの BSA-FL または OVA-FL に対する応答が阻害されることが分かった。以上より、BSA-FL 抗原特異性がキャリアー蛋白質に関係がないことが分

かった。また、フリー状態の FL の添加により抗原応答性が減少したことから、同じ BSA 分子上に融合した FL の別々の抗体-受容体キメラとの結合により受容体ダイマーまたはオリゴマーを誘導することが示唆された。

5.3.7. 抗体-受容体キメラ刺激実験

増殖アッセイの結果では抗原 BSA-FL に対する細胞増殖応答性を示さなかった抗体-受容体キメラもあったが、その一方、BSA-FL に対して濃度依存性細胞増殖を示した抗体-受容体キメラもあった。抗原に応答する細胞増殖シグナルを刺激実験により解析した。構築した抗体-受容体キメラの細胞内ドメインが gp130 であるから、gp130 によるシグナル伝達経路になると考えられる。Gp130 がリガンドによりダイマーまたはオリゴマーになり、細胞内ドメインにいくつかのチロシンキナーゼが結合する(122, 123)。IL-6 が Wild-type gp130 レセプターと結合する時のシグナル伝達では、Janus kinase (JAK)ファミリー(16, 124)の JAK1, JAK2 と TYK2 が gp130 細胞内ドメインに結合することが報告された(125-128)。gp130 シグナル伝達経路中で重要なシグナル伝達蛋白質は JAK1, STAT3 である(69, 125, 129-131)。そのほかに骨髓腫では gp130 により PI3-K/Akt シグナル伝達経路が活性化されるという報告もあり(132)、また、gp130 により ERK 経路が活性化されたという報告もあった(133)。構築した抗体-受容体キメラの抗原応答性シグナルはどの経路によるかを調べるために、それぞれの経路で代表的なシグナル伝達蛋白質 Akt, ERK, STAT3 のリン酸化状況を調べた。抗原応答性細胞増殖を示した抗体-受容体キメラをリガンドにより刺激した後、ライセートを取って、それらの蛋白質のリン酸化の度合を Western Blotting により評価した。

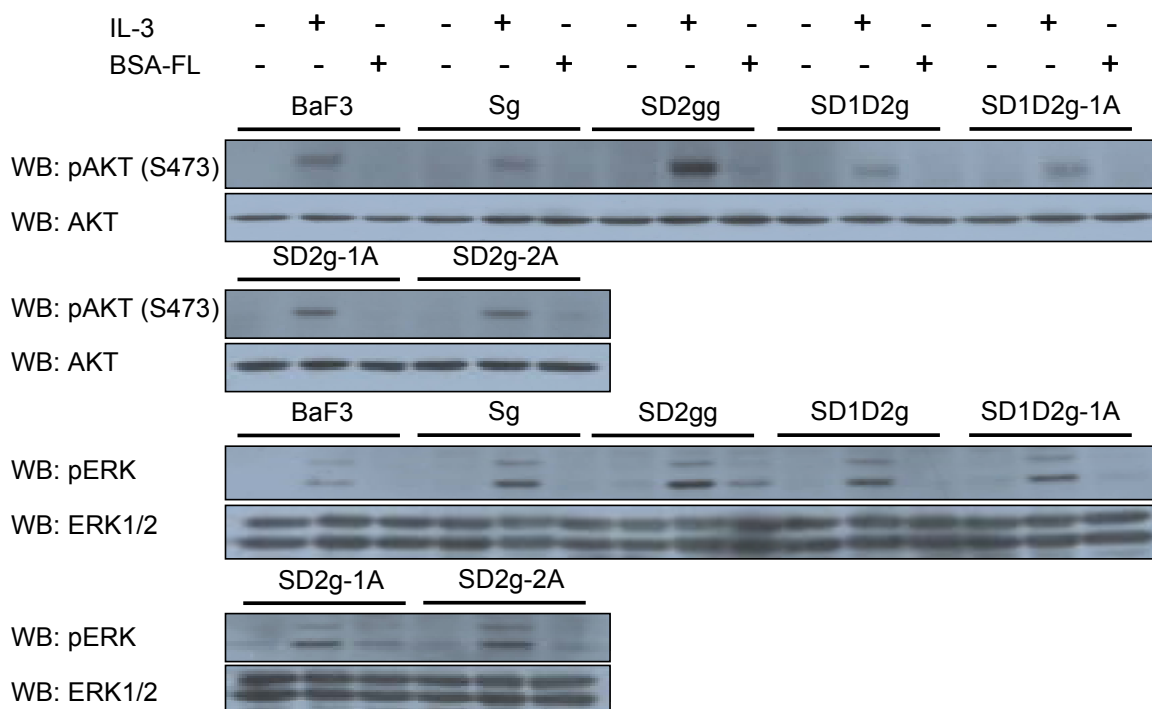


Fig. 5-13 Akt と ERK のリン酸化状況

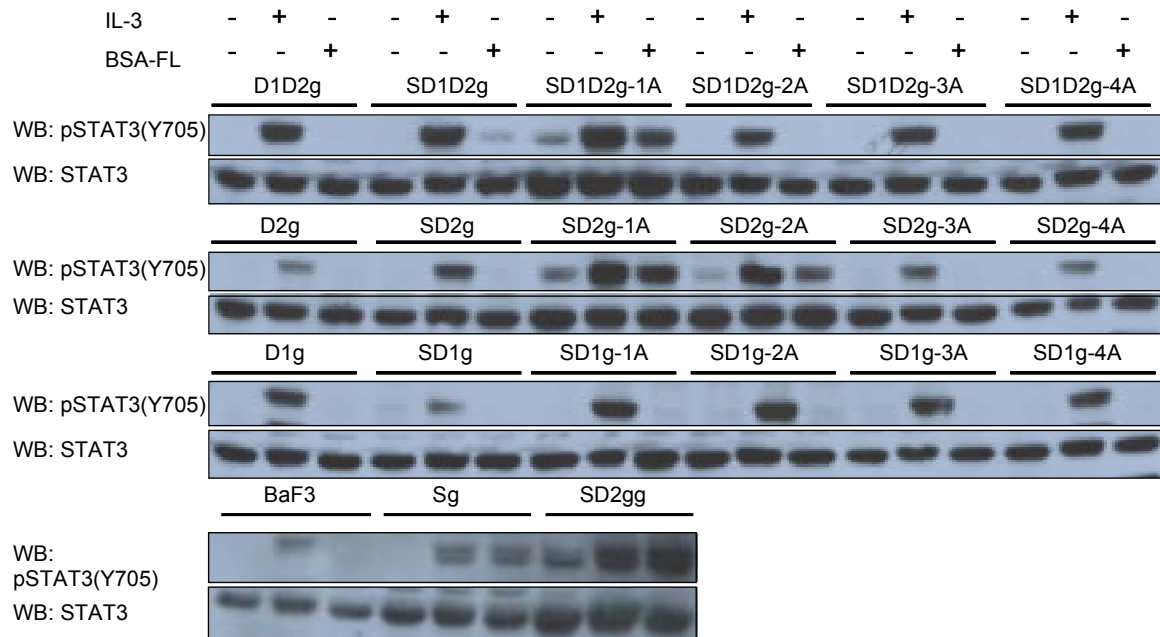


Fig. 5-14 STAT3 のリン酸化状況

Akt 経路と ERK 経路は細胞増殖シグナルの主な経路として知られているが、今回構築した抗体-受容体キメラの中で BSA-FL 応答性抗体-受容体キメラによる Akt と ERK のリン酸化を調べたところ (Fig. 5-13), Akt と ERK のリン酸化の検出はできなかった。それらの抗体-受容体キメラを発現した細胞の増殖は Akt 経路または ERK 経路による増殖シグナルがほとんどないことが分かった。一方, JAK-STAT 経路にある STAT3 のリン酸化を調べたところ (Fig. 5-14), 増殖応答性に対応した STAT3 のリン酸化レベルが検出された。

以上より抗体-受容体キメラを発現している細胞の BSA-FL 応答性細胞増殖は JAK1-STAT3 経路による増殖シグナルが大きく寄与することが示唆された。

5.4. 考察

細胞増殖を厳密に ON/OFF 制御のできる抗体-受容体キメラの構築するために, N 末端に HA-tag のついた ScFv 融合した抗体-受容体キメラシリーズを構築した。細胞外ドメインとして EpoR 細胞外ドメインの D1D2 共にある抗体-受容体キメラ, D1 または D2 のみを持つ抗体-受容体キメラ, または細胞外 D1D2 ドメインを共に削除した構造を持ち, 膜貫通ドメインは EpoR 膜貫通ドメインであり, 細胞内ドメインは gp130 細胞内ドメインである抗体-受容体キメラシリーズを構築した。細胞内ドメインの配向性がシグナル伝達に与える影響を調べるために, 膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を一つから四つまで挿入することにより細胞内ドメイン配向性を変化させた。D1D2 抗体-受容体キメラの中で SD1D2g と SD1D2g-1A では BSA-FL に応答して細胞が増殖した。D2 抗体-受容体キメラの中では SD2g-1A と SD2g-2A も BSA-FL に応答して細胞が増殖した。それに対して D1 抗体-受容体キメラは全部抗原応答性が

なく死滅してしまった。細胞外ドメインの差により抗原応答性細胞増殖が変化したことから、細胞外ドメインはシグナル伝達に大きな影響を持っていることが示唆された。また、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間の Ala 残基の挿入により細胞内ドメイン配向性が変わり、抗原応答性細胞増殖も大きく変わった。SD1D2g または SD1D2g-1A の抗原応答性細胞増殖は Ala 残基の挿入によりなくなった（SD1D2g-2A ～ SD1D2g-4A）、同じように SD2g-1A または SD2g-2A の抗原応答性細胞増殖も Ala 残基の挿入によりなくなった（SD2g-3A と SD2g-4A）。一方、SD2g では抗原応答性細胞増殖がなかったが、Ala 残基の挿入により、SD2g-1A では細胞増殖があった。Ala 残基の挿入により細胞内ドメイン配向性が変わり、シグナル伝達にも大きな影響を与えたことから、細胞内ドメイン配向性のシグナル伝達への重要性が示唆された。

細胞表面での抗体-受容体キメラ発現量をみたところ、D1 抗体-受容体キメラの表面発現量は D1D2 抗体-受容体キメラまたは D2 抗体-受容体キメラより低い傾向を示した。4 章で述べたように、EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラでも同じような傾向を示した。以上の結果から、EpoR 細胞外 D2 ドメインは抗体-受容体キメラの抗原依存性細胞増殖だけではなく、細胞表面発現量にも大きく関与していることが示唆された。また、抗体-受容体キメラの細胞表面発現量と抗原応答性細胞増殖を比較したところ、細胞表面発現量も多少の影響はあるが抗体-受容体キメラの構造が抗原応答性細胞増殖シグナル伝達に重要であることが示唆された。

構築した抗体-受容体キメラの中で EpoR 細胞外ドメイン D1D2 を共に削除され、ScFv が直接に EpoR 膜貫通ドメインに融合し、gp130 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラ Sg では、厳密に BSA-FL 依存性細胞増殖の ON/OFF 制御ができた。この研究をさらに進めて、抗体-受容体キメラ Sg の ScFv 部分をライブラリー化し、細胞表面に抗体ライブラリー抗体-受容体キメラを発現させて、そこに抗原を添加して増殖する細胞を回収すれば抗体ライブラリー選択ができると考えられる。

6. 抗体-受容体キメラを用いた抗 hSOD1 抗体ライブラリーの選択

6.1. 序論

多くの病気は体内にあるたんぱく質の突然変異に関連していることが、研究により明らかになってきた。ヒトのプリオンタンパク質遺伝子によく見られる突然変異 (E200K) は、家族性(遺伝性)クロイツフェルトーヤコブ病(CJD)と関連性を有することが報告された(134, 135); フィブリンタンパク質にはフィブリン-1 とフィブリン-2 というよく似た 2 つがあることが分かっている。フィブリン-1 遺伝子の突然変異で Marfan Syndrome (MFS) がおこり(136-138), フィブリン-2 遺伝子の突然変異ではこれと類似の先天性拘縮性クモ指症 congenital contractural arachnodactily (CCA) がおこる(139-141)。エラスチン遺伝子の突然変異では弁上部狭窄 supralvalvular aortic stenosis (SVAA) がおこることが分かった(142-144)。筋萎縮性側索硬化症 ALS(43)も遺伝性 ALS の 20%程度を占めるとされ、常染色体優性遺伝の ALS1 は 21 番染色体上の hSOD1 (スーパーオキシドジスムターゼ 1 遺伝子) の突然変異が関与していることが分かった(44, 45)。突然変異たんぱく質に関連する病気またはガンなどの治療では抗体医薬が大きく期待されている。アメリカ食品医薬品局 FDA (Food and Drug Administration) の許可を得た第一号抗体医薬品は移植拒絶反応に用いられ、T cell の CD3 Receptor をターゲットにした murine IgG2a 抗 CD3 抗体 Muromonab (OKT-3)であった(145)。それ以来たくさんの抗体医薬品の開発に成功した。今ではガンをはじめ、いろいろな病気の治療に抗体医薬品が販売、使用されている(146-148)。抗体は疾患治療で高い効果を示すことから、抗原特異性を持つ抗体の作成に期待が集まっている。従来、抗体の獲得法として、動物への抗原の免疫が用いられてきたが、生体毒性の高い抗原を免疫できない、そのままでは単価抗原に対する抗体が得られない、時間がかかるなどの欠点がある。そこで *in vitro* で抗体ライブラリーを作製して、その中から抗原特性を示すモノクローナル抗体を選択する手法が開発された。現在行われている主な *in vitro* 抗体ライブラリー選択法としてファージディスプレイ法が挙げられる(41)。ファージとは微生物を宿主とするウィルスのことで、抗体など目的蛋白質の遺伝子をファージのコート蛋白質と融合させることで、ファージの表面に目的蛋白質を発現させることができる。ファージ表面に目的蛋白質を“提示”し、内部にその目的蛋白質の遺伝子情報を有した、蛋白質-遺伝子一対のシステムが可能となる。この原理に基づいて作製したファージ抗体ライブラリーを用い、親和性による選択を *in vitro* でパニング操作により抗体選択できるが、非特異的結合クローンが取れやすく、操作が煩雑といった欠点がある。そのほかにリボゾームディスプレイ法(42)があり、*in vitro* でランダム DNA ライブラリーを大腸菌の S30 無細胞転写/翻訳系に添加してペプチドを合成する。*in vitro* での操作であるがためにタンパク質がワイルドタイプと同じようなフォールディングができるのは保障できない問題点もあり、また、ファージディスプレイ法と同様に繰り返しサイクルがあるため操作が煩雑であるなどの問題点もある。

そこで簡単な操作で抗原特異性の高い抗体を取得する抗体ライブラリースクリー

ニング方法を開発しようと考えた。本研究で、われわれは抗原存在下でのみ増殖シグナル伝達が生じる抗体-受容体キメラを用いて、抗体-受容体キメラの抗体部分をライブラリー化し、抗体ライブラリーの中から、任意の抗原に対して、増殖活性を指標として高い結合能を持つ抗体を迅速且つ簡便にスクリーニングする手法を開発することを目的とした。

動物に目的抗原を免疫させてから脾臓を取り出して、脾臓細胞のトータル RNA を分離してから RT-PCR により V_H 鎖あるいは V_L 鎖部分のみ、または抗体 ScFv 部分を増幅させることにより、抗体ライブラリーを取得する方法がある。または、抗原結合部位に予測したアミノ酸残基あるいは抗体の抗原に対する相補性決定領域 CDR (complementarity determining region) 部位を Error-prone PCR により無作為変異を導入して抗体ライブラリーを構築できる。そのほかに現有の抗体ライブラリー、例えば、Tomlinson I または Tomlinson J ライブラリー(149)もあり、そのまま利用可能である(150)。

抗体-受容体キメラを用いた抗体ライブラリー選択法の具体的な操作としては、これまで構築した抗体-受容体キメラの中で得られた厳格な抗原 BSA-FL に対する依存性を示した抗体-受容体キメラ Sg(151)の ScFv 部分を抗体ライブラリーに置換した抗体ライブラリー抗体-受容体キメラを構築し、細胞への高効率の導入が可能であるレトロウィルスベクターに組み込む。このレトロウィルスベクターを IL-3 依存性の Ba/F3 細胞に感染させ、抗体ライブラリー抗体-受容体キメラを細胞表面に発現させる。感染細胞に IL-3 を含まず目的抗原を添加した選択培地で培養すると、抗原結合活性を持たない抗体-受容体キメラを発現している細胞は死滅し、細胞表面に発現した抗体-受容体キメラの ScFv 部分が目的抗原と結合すれば抗体-受容体キメラが活性化され、細胞増殖シグナル伝達するようになり、目的抗原と結合活性がある場合のみ増殖することが期待される。このように、増殖したクローンを回収することで、目的抗原への特異的結合能を持つ抗体遺伝子を選択する。細胞の生死だけで抗原結合活性を持つ抗体クローンを選択できるから、短い時間かつ簡単な操作で抗原特異性を持つ抗体の取得ができると期待される。

本研究では、生理的条件下でダイマー状態になる hSOD1 を抗原として使い、hSOD1 を使って免疫したマウスの脾臓細胞から RT-PCR 法により、Anti-hSOD1 抗体ライブラリー V_H 鎖、 V_L 鎖または ScFv 部分を増幅させ、得た抗体ライブラリーを抗原依存的に細胞増殖の ON/OFF 制御のできた抗体-受容体キメラ Sg の ScFv 部分と置換して、Anti-hSOD1 抗体抗体-受容体キメラライブラリーを構築した。抗体-受容体キメラライブラリーを BaF3 細胞表面で発現させ、hSOD1 を添加して培養した。hSOD1 に対する増殖依存性を示したクローンをピックアップして、抗体部分の遺伝子を取得してから発現ベクターに組み込ませて、COS-1 細胞で抗体を発現させた。取得した抗体クローンの hSOD1 に対する結合性を Sandwich ELISA 法により評価した。その結果いくつかの hSOD1 に対する Affinity を示したクローンを取得できた。

本研究で行っている抗体ライブラリー選択法により単独なクローンとして取得で

きる。取得したクローンの hSOD1 に対する Affinity を評価できる。さらに、抗体クローンの配列を分析して比較することにより、hSOD1 との結合に關与するアミノ酸部位を推測でき、それらの知見に基づいて、得た抗体クローンにより新しい抗体ライブラリーが作製でき、さらなる Affinity の高い抗体の取得ができる。また、変異の入った hSOD1 を添加して抗体ライブラリーの選択もでき、取得した抗体クローンの配列を分析して、正常な hSOD1 により取得したクローンの配列と比較することにより、hSOD1 にある変異部位を推測でき、疾患の診断と治療につながる。

6.2. 実験方法

6.2.1. 抗体-受容体キメラ Sg

使用する予定の抗体ライブラリー遺伝子の前後に *SfiI* と *NotI* サイトが付いており、*SfiI* と *NotI* により抗体ライブラリー遺伝子を切り出して、同じ制限酵素で処理したベクターに組み込ませる手法で作製した抗体-受容体キメラライブラリーを構築するときにはベクターとして使ったのは抗体-受容体キメラ Sg である。Fig. 6-1 に示したように、抗体-受容体キメラ Sg の中にある ScFv 部分の前後に *SfiI* と *NotI* サイトを作る必要がある。*NotI* サイトを作ってから、pDisplay ベクターより *SfiI* サイトを導入した。

1. 抗体-受容体キメラ Sg 遺伝子にある *NotI* サイトを潰す必要がある。抗体-受容体キメラ Sg 遺伝子を *NotI* 処理してから、Blunting high kit (Toyobo, Osaka, Japan) を使って Blunting を行ってから、Ligation High (Toyobo, Osaka, Japan) により Ligation をおこなった。以上の操作で抗体-受容体キメラ Sg ベクターにある *NotI* サイトを潰した。
2. *NotI* サイトの潰された抗体-受容体キメラ Sg 遺伝子を Template にして、Primer : Lib For 5' - GGG GCC AGG GAA CCC TGG TCA CCG -3' ; Lib Rev 5' -GGG TCC GGA ACC TGC GGC CGC TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC-3' を使って *NotI* サイトの潰された抗体-受容体キメラ Sg にある ScFv 遺伝子 3' 部分に *NotI* サイトを新しく作った。
3. pDisplay ベクターを *EcoRI* と *NotI* で切り出した断片を、同じ制限酵素で処理した Sg (New *NotI*) ベクターに組み込ませて、LibSg ベクターを構築した。

6.2.2. Anti-hSOD1 抗体ライブラリー作製

1. SOD1 ノックアウトマウスをヒト SOD1 タンパクで免疫した。
2. マウス血清中に SOD1 抗体ができていることを確認した後、脾臓を取り出した。
3. 脾臓から mRNA を抽出した。
4. リコンビナント抗体発現システム(mouse ScFv module recombinant phage antibody System (GE Healthcare))のプロトコール通り、V_L 部分と V_H 部分を RT-PCR で増幅した。
5. V_L の PCR 産物と V_H の PCR 産物を結合させて PCR を行い、ScFV ライブラリー

を作製した。作製した V_H 鎖のみ, V_L 鎖のみまたは ScFv ライブラリーの 5' 末端に *SfiI* 制限酵素サイト, 3' 末端に *NotI* サイトをつけた。

6.2.3. 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの構築

本研究に使った Anti-hSOD1 抗体遺伝子断片ライブラリーは 6.2.2 で説明したように, 共同研究先の兵庫医科大学藤原先生により作製された。すなわち, マウスに hSOD1 を三回に分けて hSOD1 1ml を注射して免疫し, 免疫されたマウスの脾臓細胞から Total RNA を分離して, それを Template にして RT-PCR 法を用いて, V_H 鎖または V_L 鎖部分を増幅させ, さらにそれをもとに ScFv を増幅させた。増幅に使う Primer により抗体ライブラリー遺伝子の前後に *SfiI* と *NotI* サイトが付けられた。

一回目の抗体ライブラリー遺伝子を作製する際には, Anti-hSOD1 V_H Library の作製では, Primer としては V_H *SfiI* 5' -GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GGA-3' ; V_H *NotI* 5' -TGA GGA GAC GGC GGC CGC GGT YCC TTG RCC CCA GTA GTC-3' を使用した。

二回目に免疫した 134 番目のメスマウスから抗体ライブラリーを作製し, 作製したライブラリーを ♀134 と名づけた。♀134Anti-hSOD1 V_H Library の作製では, Primer として V_H *SfiI* 5' -GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GGA-3' ; V_H *NotI* 5' -TGA GGA GAC GGC GGC CGC GGT YCC TTG RCC CCA GTA GTC-3' を使用した。

♀134Anti-hSOD1 V_L Library の作製では, Primer としては V_L *SfiI* 5' -GAG GTG GCT CCG GCC CAG CCG GCC ATG GAC ATT GWG MTS ACM CAR TCT -3' ; V_L *NotI* 5' -GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT KAK YTC CAR CTT KGT SCC -3' を使用した。

♀134Anti-hSOD1 ScFv Library の作製では, Primer としては ScFv *SfiI* 5' -TTA CTC AAG ATA AAT GGA TGG GTA TAT TGC TCA CAT TGG TGC CGA GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG-3' ; ScFv *NotI* 5' -CAG GTA TTT TAG ATA TGA ATA CTG TAG TGT TAC AAG AAG GTG AAC ACT TAT ATT GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG-3' を使用した。

使用した Primer により作製された抗体ライブラリー遺伝子の前後には *SfiI* と *NotI* サイトがつけられている。*SfiI* と *NotI* で処理した抗体-受容体キメラ LibSg をベクターとして使い, 同じ制限酵素で処理した抗体ライブラリー遺伝子を組み込ませて抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーを構築した (Fig. 6-2, 3)。①, Fig. 6-2 には 1st V_H 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの構築を示した。脾臓細胞から RT-PCR 法を用いて V_H 鎖部分だけを増幅させた後, ファージベクターに組み込ませて, Phage Display 法により数回 Panning した抗体ライブラリーを得た。そのライブラリーを *SfiI* と *NotI* で処理して, LibSg ベクターに組み込ませて 1st V_H 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーを構築した。②, Fig. 6-3 には ♀134 V_H , V_L , ScFv 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの構築を示した。脾臓細胞から RT-PCR 法を用いて V_H , V_L , または ScFv 部分を増幅させた後, *SfiI* と *NotI* で処理して, LibSg ベクターに組み込ませて, 抗体-受容体キメラ

抗体ライブラリーを作製した。

6.2.4. Electroporationによる大腸菌の形質転換及び細胞への遺伝子導入

構築した抗体-受容体キメラ抗体ライブラリー遺伝子をエタノール沈殿して、リンスでは70%EtOH 1ml入れる数分逆さにして放置した後、遠心した。上清を除き、乾燥させる。乾燥された遺伝子に滅菌水で溶かした。使う滅菌水の量はElectroporation Competent *E. coli*量の5%以下にすること。遺伝子溶液をElectroporation Competent *E. coli* MegaX DH10B T1R Electrocomp cells kit(Invitrogen) に加えた。Gene Pulser Xcell system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を使って、2.0 kV, 200 Ω , 25 μ Fの条件でパルスをかけた。形質転換を行った大腸菌にDH10B T1R Electrocomp cells kit(Invitrogen)にあるリカバリバッファーを加えて37°C, 225rpmで60 Min振とう培養した。その後、大腸菌を100 μ g/ml ampicillinの入ったLB Agar Plateにまいて、37°C, 16Hr培養する。この段階で得られたコロニーの数をライブラリーサイズとした。

Fig. 6-4 のように、構築した抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーを Electroporation により大腸菌に形質転換してから、すべてのコロニーを回収し、さらに培養した。大腸菌から抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーPlasmid を回収した。回収された抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーPlasmid をレトロウィルスにより BaF3 細胞に導入する、細胞表面で抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーを発現させた。

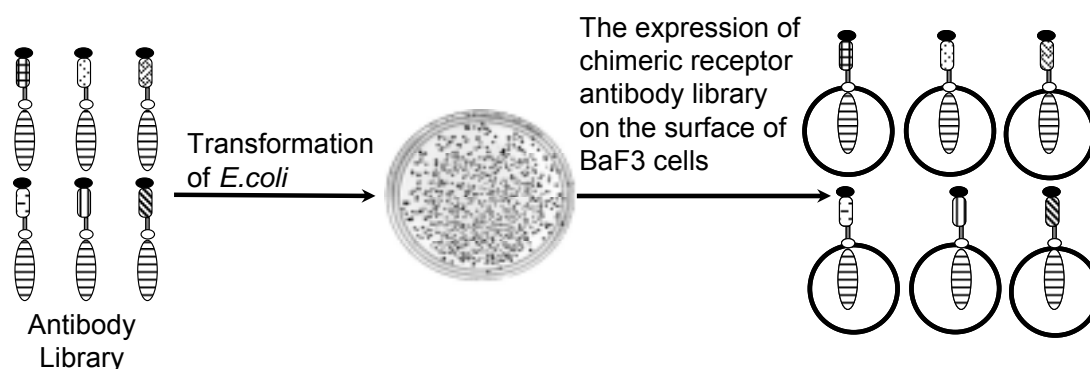


Fig. 6-4 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの細胞表面での発現



Fig. 6-5 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの遺伝子構造

構築した抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの遺伝子構造はFig. 6-5に示してある。抗体-受容体キメラ遺伝子は IRES により EGFP と共発現する構造になっている。FACS 測定により遺伝子導入率などの測定ができる。

6.2.5. 細胞の培養及び抗体-受容体キメラ抗体ライブラリー遺伝子導入

Ba/F3細胞の培養は4.2.2部分を、Plat-E細胞の培養は4.2.3と同様に行った。抗体を一過性発現させるためにCOS-1細胞を使用した。抗体発現ベクターをCOS-1細胞に導入して抗体を発現させた。COS-1細胞の培地は10% FBS, kanamycin 30 µg/mL入りのDMEM（日水製薬）を用い、培養は37 °C, 5% CO₂ インキュベータで行う。レトロウィルスを利用して構築したベクターをBa/F3細胞に導入した。具的な操作は4.2.5に説明した。

6.2.6. フローサイトメーターによる遺伝子導入効率の確認

得られた細胞をPBSで一度洗浄した後、Isoflow (Beckman Coulter, Fullerton, CA)に再び懸濁し、FACS Calibur (Beckton Dickson)を用いて測定を行った。また、4.2.6に説明したように細胞表面での抗体-受容体キメラ表面発現量を測定した。

6.2.7. 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリー選択

BaF3 細胞表面に抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーを発現させて、フローサイトメーターによる遺伝子導入効率を確認して、ライブラリーのサイズを計算した。抗原特異性を持つ抗体を発現させた細胞を単独クローンとしてピックアップしたいが、1/1000 の確率で抗原特異性を持つクローンを選択できると予測して、EGFP 陽性細胞を 1000 cells/well のように 96-well plate にまいた。そこで抗原入りの培地を添加して培養することにより抗体ライブラリー選択を行った。今回構築した抗体ライブラリーの抗原である hSOD1 を培地に添加して細胞を培養した。数日間後増えてきた Clone を回収して、24-well plate に回収したクローンを増やした。取得したクローンが抗原非依存性増殖による細胞増殖か、または添加した抗原に応答して増殖してきたかを評価するために、回収したクローンを一定の量まで増殖させてから、細胞を集めて、PBS で2回洗浄した後、同じ量を二つの Well に加え、一つの Well にはリガンドなし、もう片方の well に抗原 hSOD1 を添加して培養した。抗原ありなしによる細胞増殖の差を示したクローンを回収した。回収したクローンは添加した抗原に対する Affinity を持つと考えられる。

6.2.8. 細胞ゲノム抽出及び抗体断片の増幅

添加した抗原に対するAffinityを持つと考えられるクローンから試薬GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (GE Healthcare Life Sciences)を使って、細胞からゲノムを抽出した。

1. 培養した細胞を20 °C, 3000g, 3 min 遠心し、上清をアスピレーターで廃棄して、新しいDMEM 1mlで懸濁する。細胞数を数えて、 4×10^6 cellsを集めた
2. 4×10^6 cellsを1.5 mlエッペンチューブに移して、15000g, 5sec遠心し、上清を20-40µLを残るように吸い取った。細胞を十分に懸濁してから600µL cell lyses bufferを添加してから懸濁した。

3. RNase処理を行うために、懸濁した細胞液に3 μ L RNaseを加えて、十分に混ぜてから37 $^{\circ}$ C, 50 Minインキュベートした。
4. 細胞内たんぱく質を除去するために、さらに溶液に200 μ L Protein precipitin solutionを加えて、十分に混ぜてから、15000g, 3Min遠心した。
5. 上清を新しい1.5 mlエッペンチューブに移し、600 μ L イソプロパロールを添加して、エッペンチューブを上下に反転により溶液を混ぜた。
6. 15000g, 1Min遠心する、上清を除いてから600 μ L 70% EtOHを添加してゲノムDNAを洗浄する。15000g, 1Min遠心して上清を除く。ゲノムDNAを乾燥した。
7. 乾燥したゲノムDNAに100 μ L Hydration Solutionを添加して、65 $^{\circ}$ C, 60 MinインキュベートすることによりゲノムDNA溶液を得た。

抽出したゲノムをTemplateにしてPrimer (LibS-gpGenomicPCRFor 5'-GGT TCC ACT GGT GAC TAT CC-3', LibS-gpGenomicPCRRev 5'-CCA CGA GGA TGA GGG AGA GCG -3') により抗体部分を増幅させた。

6.2.9. 抗体発現ベクターの構築

抗体を発現させるために、増幅した抗体断片を発現ベクターpDisplay (Invitrogen)に組み込ませて抗体発現ベクターを構築した。増幅した抗体断片の前後に*Sfi*Iと*Not*Iサイトがあり、同じ制限酵素でベクターを処理してから抗体断片を組み込ませて抗体発現ベクターを構築した。可溶性抗体を発現させるために、制限酵素*Not*Iサイトの後ろにStop codonをつける必要がある。また、その後の検出に使うためにHis-tagもつけた。ベクターpDisplayをもとにして、本研究で使う発現ベクターLibpDisplayを構築した。ベクターpDisplayをTemplateにして、Primer (LibpDisplayFor 5'-ggg GGC GGC CGC TCA TCA TCA TCA CCA TCA CtG AGA TCA GCC TCG ACT GTG CC-3', LibpDisplayRev 5'-ggg GAG CCC ACC GCA TCC CCA GCA TGC CTG CTA TTG TCT TCC CAA TCC TCC CC-3')によりPCRで*Not*Iサイトの後ろにHis-tagとStop codonをつけた。増幅した断片を*Not*Iと*Bbs*Iで処理して、切り出した断片を同じ制限酵素で処理したベクターpDisplayに組み込ませて抗体発現ベクターLibpDisplayを構築した。取得したクローンのゲノムからGenomic PCRにより増幅した抗体断片を*Sfi*Iと*Not*Iで処理して、切り出した抗体遺伝子断片を同じ制限酵素で処理した抗体発現ベクターLibpDisplayに組み込ませて、抗体クローンを発現する抗体発現ベクターを構築した。

6.2.10. Sandwich ELISA法

抗体ライブラリーから取得したクローンを発現ベクターに組み込ませてCOS-1細胞に導入し、培養上清に可溶性抗体として発現させた。発現された抗体のN末端にHA-tag, C末端にHis-tagがついている。Sandwich ELISA法で回収した培養上清にある抗体の濃度を確定した。Sandwich ELISA法：

1. 96-well ELISA plate (BD Falcon, San Diego, CA)に一次抗体としてAnti-HA抗体 (Bethyl Inc.)を1 μ g/ml, 100 μ L/well加えて、室温2Hrまたは4 $^{\circ}$ C O/NでBindingした。

2. PBSにより3回Washした。
3. PBSで20%に希釈したイムノブロック(大日本住友製薬)を300 μ L/well加えて、室温 2Hr Blockingを行った。
4. PBSにより3回Washした。
5. 回収した可溶性抗体の含めてある細胞培養上清を100 μ L/well加えて、室温 1Hr放置した。
6. 終濃度0.1%になるように、PBSにTween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate, Wako, Japan)を添加したPBSTより3回Washした。
7. 4000倍希釈したHRP (HorseRadish Peroxydase)標識Anti-Hisを100 μ L/well加えて、室温 1Hr放置した。
8. PBSTによりWash, 3回行った。
9. 発色反応を行う, 基質として100 μ L/well :100 μ g/ml TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Dojindo, Japan) in 100mM NaoAc pH=6.0と5000倍希釈30% H₂O₂であった。
10. 1M H₂SO₄ 50 μ L/wellを添加して発色反応をとめた。
11. 吸光度450nmを測定した。

6.2.11. hSOD1をビオチン化する

抗体ライブラリーから取得したクローンのhSOD1に対するAffinityを測定する時に、一次抗体としてはビオチン化したhSOD1を結合させ、二次抗体としてはHRP-Streptavidinを使う。

hSOD1をビオチン化する操作：

1. ビオチン化対象になるhSOD1のモル数に対して、15倍モル数EZ-Link NHS – PEG4 – biotin (Pierce Biotechnology)になるように使用量を計算した。
2. 8mg hSOD1を500 μ L 100mM NaHCO₃ (pH=8.5)に溶かす。さらに20mM EZ-Link NHS – PEG4 – biotin 185 μ Lを添加して、室温, 1Hr反応させた。
3. 反応液を透析チューブに移して、2L PBSに4℃, O/N透析を行った
4. 透析した反応液を回収して、100mg/ml NaN₃液を100倍希釈するように添加した。

6.2.12. FACSによりAffinity分析

取得したクローンにBiotin化したhSOD1と結合させ、蛍光標識したStreptavidinを用いて、フローサイトメーターにより、取得したクローンの細胞表面に発現されてある抗体-受容体キメラにある抗体部分のhSOD1に対するAffinityの測定ができる。操作手順：

1. 取得したクローン細胞を15000個集めた。
2. 500 μ g/mL Biotin-hSOD1 in PBSを50 μ L加えて、懸濁してから、氷上, 30 Minでインキュベートした。
3. 3000g, 5min 遠心する。PBS 1 mLでWashした。

4. 44 µg/mL PE標識したStreptavidin in PBSを50µL加えて、懸濁してから、氷上、30 Minでインキュベートした。
5. 3000g, 5min 遠心する。PBS 1 mLでWashした。
6. PBSの中でFACSにかけて、hSOD1に対するAffinityの測定を行った。

6.2.13. 抗体クローンの配列分析

Sandwich ELISA法で抗原であるhSOD1に対するAffinityを持つクローンを確認した後、抗体クローンの配列を分析した。抗体発現ベクターをTemplateにして、Primer (LibpD AllCloneSeq For 5'- GTG TGC TGG AAT TCG GC-3', LibpD AllCloneSeq Rev 5'- GCA ATT TCC TCA TTT TAT TAGG-3')により抗体断片配列を分析した。

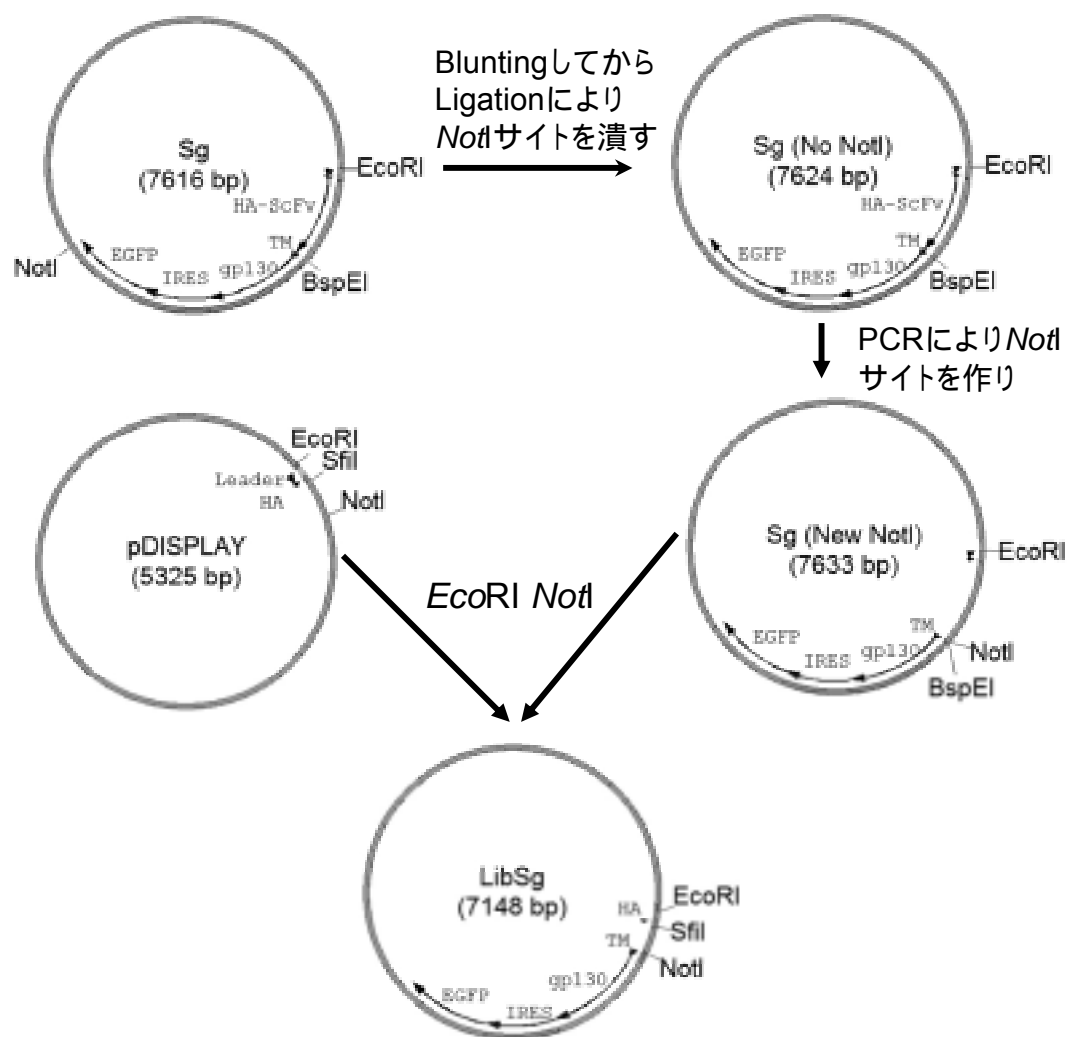
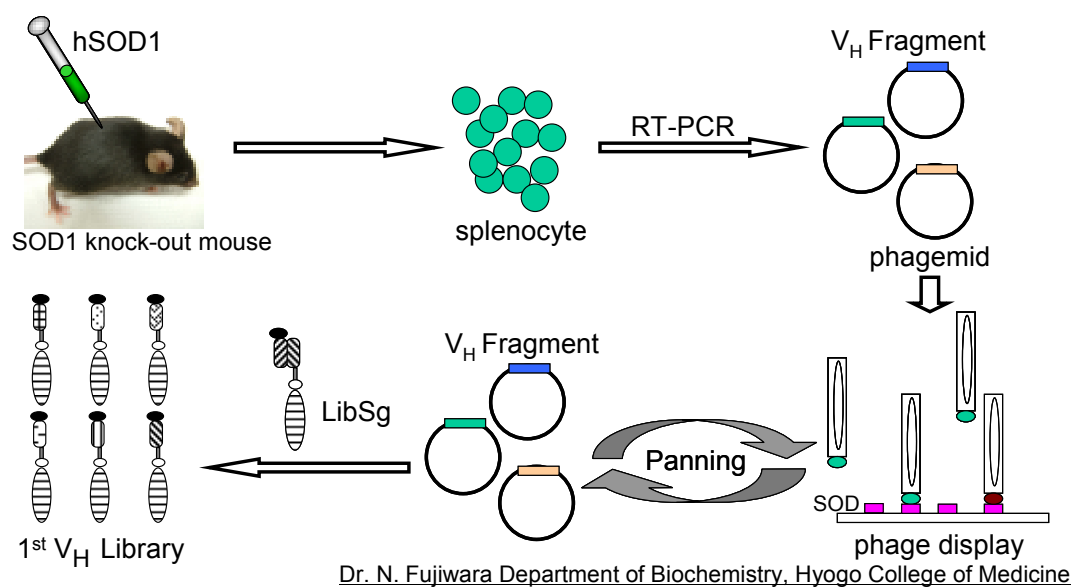
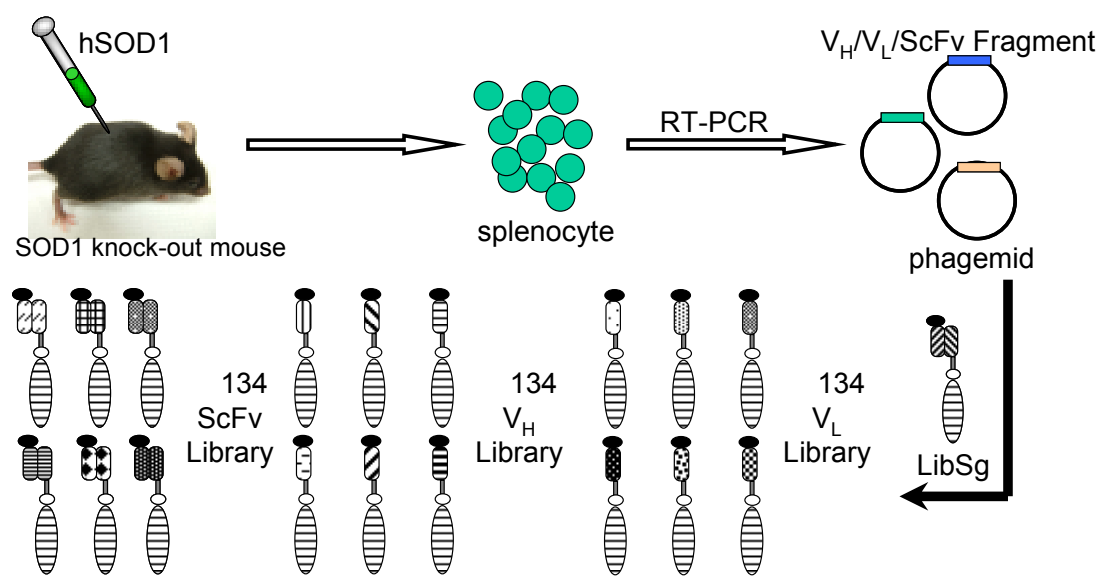


Fig. 6-1 LibSg ベクターの構築



1. Mouse was immunized with hSOD1.
2. The V_H fragments of antibody were amplified by RT-PCR from spleen cells RNA.
3. A small size of V_H fragment library was available after several times of phage display panning
4. The ScFv fragment in Sg chimeric receptor was replaced by V_H library for 1st V_H library

Fig. 6-2 1st V_H 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの構築



Dr. N. Fujiwara Department of Biochemistry, Hyogo College of Medicine

1. A named 134 mouse was immunized with hSOD1
2. The V_H and V_L fragments of antibody were amplified by RT-PCR from spleen cells, whereupon ScFv fragments were amplified using V_H and V_L fragments by 2nd PCR.
3. The ScFv fragment in Sg chimeric receptor was replaced by V_H, V_L or ScFv library for 134V_H, 134V_L and 134ScFv library individually

Fig. 6-3 ♀ 134 V_H, V_L, ScFv 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの構築

6.3. 抗体-受容体キメラを用いた抗 hSOD1 抗体ライブラリーの選択の実験結果

6.3.1. 1st V_H(♀ 134 V_H, V_L, ScFv)抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーの構築

細胞増殖 ON/OFF 制御のできた抗体-受容体キメラ Sg から、抗体ライブラリー遺伝子を組み込ませられるように、*SfiI* と *NotI* サイトを挿入した LibSg ベクターを *SfiI* と *NotI* で処理した。これに共同研究先の兵庫医科大学藤原先生により作製された V_H 鎖ライブラリーまたは♀ 134 V_H, V_L, ScFv ライブラリー遺伝子を同じ制限酵素で処理し Ligation High kit (Toyobo, Japan)によりベクター側に組み込ませた。Ligation した抗体-受容体キメラ抗体ライブラリー発現ベクターを Electroporation により MegaX E. coli DH10B T1 electrocompetent cells (Invitrogen, Paisley, UK)に形質転換を行った。得られたコロニーの数はライブラリーサイズである。得られたライブラリーのサイズを Table. 6-1 に示した。

Table. 6-1 Anti-hSOD1 抗体-受容体キメラライブラリーサイズ

抗体-受容体キメラライブラリー	ライブラリーサイズ
Anti-hSOD1 1st V _H Library	1.5 × 10 ⁵
Anti-hSOD1 134 V _H Library	7 × 10 ⁶
Anti-hSOD1 134 V _L Library	3 × 10 ⁶
Anti-hSOD1 134 ScFv Library	4 × 10 ⁶

コロニーを全部回収して、さらに 100μg/ml ampicillin 入りの LB 培地により大量培養を行った。大腸菌を 6000g, 15Min 遠心して集菌した。HiSpeed Plasmid Midi kit (Qiagen)を使って構築した抗体抗体-受容体キメラライブラリーPlasmid を抽出した。抽出した抗体抗体-受容体キメラライブラリー遺伝子をエタノール沈殿により精製する。

4.2.6- 4.2.8 で説明したように抗体-受容体キメラライブラリー遺伝子をウィルスに包み込む為のパッケージング細胞 Plat-E 細胞に Lipofectamine 試薬により導入した。Plat-E 細胞から抗体抗体-受容体キメラライブラリーをウィルスの形として放出した。Retro Nectin (Takara Japan) 試薬により、ウィルス感染効率を高められるので、そのウィルスを用いて、BaF3 細胞に感染して、BaF3 細胞表面に抗体抗体-受容体キメラライブラリーを発現させた。

6.3.2. ライブラリーから取得した抗体細胞集団の取得

本研究で開発している抗体ライブラリー選択法のメリットとしては、ファージディスプレイ法のような複雑な操作の必要がないことがあげられ、目的抗原を添加した培地により

細胞培養を行い、増殖した細胞を回収するだけで、目的抗原に対する抗体クローンを取得できると考えている。

培地に抗原を添加して細胞培養を行うので、抗原が細胞に対する毒性を持つとこの選択方法は遂行できない。抗原としては、ダイマー以上であるのは一つの条件であり、もう一つの条件としては使う細胞に対する毒性がないことである。本研究では Wild type ではダイマーである hSOD1 を抗原として使った。まず hSOD1 が BaF3 細胞に対して毒性を持つかどうかを評価した (Fig. 6-6)。IL-3 入り培地にいろいろな濃度の hSOD1 を添加して BaF3 細胞培養を行ったところ、hSOD1 濃度が 100ng/ml 以上になると、細胞毒性の影響を無視できなくなったので、抗原依存性細胞増殖を評価するために、hSOD1 濃度を 100ng/ml 以下にする必要があると考えられた。

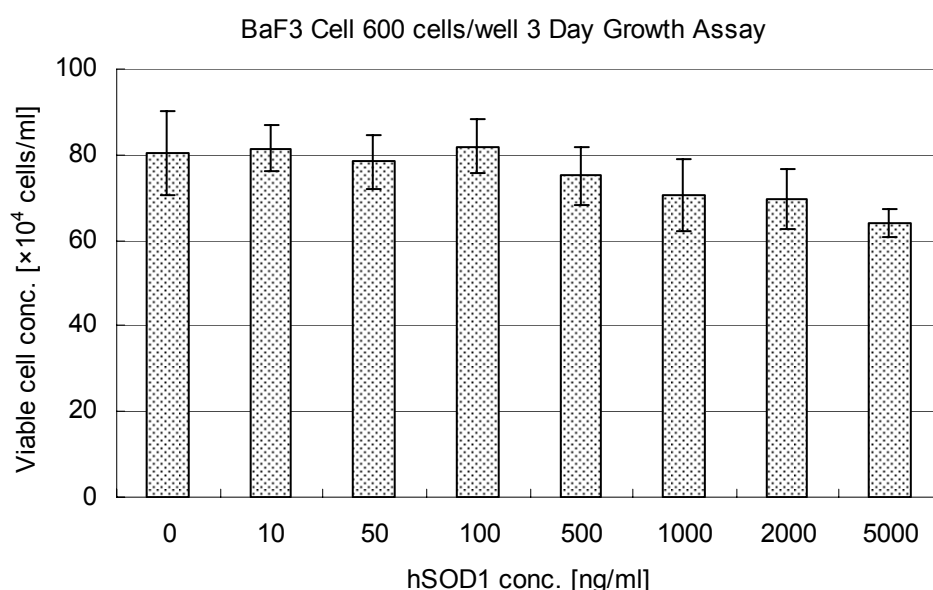


Fig. 6-6 hSOD1 の BaF3 細胞に対する細胞毒性

本研究の発想としては、モデル系として Anti-FL ScFv を用いて、抗原である BSA-FL に対して、抗原非依存性細胞増殖のない抗体-受容体キメラを構築できれば、抗体 ScFv 部分をライブラリー化して、抗体ライブラリー中に含まれている、目的抗原に対する Affinity を持たないクローンも抗原非依存性細胞増殖性がないから死滅すると考えた。1st V_H (♀ 134 V_H , V_L , ScFv) 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーを発現した BaF3 細胞の培地に抗原である hSOD1 を 10 μ g/ml 添加して数日間培養した後、増殖してきたクローンを回収することにより抗体クローンを取得できると考えた。

しかし、モデル系として Anti-FL ScFv を用いて、細胞増殖 ON/OFF 制御のできた抗体-受容体キメラ Sg(151) の ScFv 部分を Anti-hSOD1 抗体ライブラリーに置換して構築した 1st V_H (♀ 134 V_H , V_L , ScFv) 抗体-受容体キメラ抗体ライブラリーを発現した BaF3 細胞では、抗原非依存性細胞増殖が見られてしまった。そこで、増殖してきた細胞集団が抗原に应答

して増殖してきたか、または抗原非依存性細胞増殖によるものを区別するためおよび、添加した hSOD1 に対する増殖依存性を評価するために簡易 Growth Assay を行った、すなわち、増殖してきた細胞集団を回収して 96-well plate から 24-well plate に移し、さらに細胞数を増やしてから、PBS Wash により培地に含まれているリガンドを除いて、二つの well に同じ細胞数を添加してから、それぞれの well に hSOD1 を添加した培地と添加していない培地で培養した。結果は Table 6-2 に示した。増殖してきた細胞集団の殆どは抗原非依存性増殖によるものであることが分かった。しかし、リガンドのありなしによる細胞増殖速度の差を示した細胞集団が少数存在し、これらは抗原に対する Affinity を持っていると考えられたので以後の実験に用いた。

Table. 6-2 Anti-hSOD1 抗体-受容体キメラライブラリー選択

抗体-受容体キメラライブラリー	ライブラリー サイズ	ピックアップした クローン数	簡易Growth Assayに おいて抗原応答性が あったクローン数
Anti-hSOD1 1st V _H Library	1.5×10^5	25	3
Anti-hSOD1 134 V _H Library	7×10^6	360	10
Anti-hSOD1 134 V _L Library	3×10^6	360	5
Anti-hSOD1 134 ScFv Library	4×10^6	642	6

これらの hSOD1 応答性が示唆された細胞集団に対して、抗原依存性細胞増殖を抗原である hSOD1 濃度を 100ng/ml 以下にした Growth assay で評価した。Fig. 6-7 では Anti-hSOD1 1st V_H Library より取得したクローン V_H01, V_H02 と V_H03 の抗原依存性細胞増殖を示した。

Anti-hSOD1 ♀ 134V_H Library から同様にいくつかの細胞集団を取得した、代表例として、Anti-hSOD1 ♀ 134 V_H Library から H6 と H31, Anti-hSOD1 ♀ 134 V_L Library から L8 と L11, Anti-hSOD1 ♀ 134 ScFv Library から S8 と S10 を選び、それらの細胞集団の抗原依存性細胞増殖を Fig. 6-8 に示した。

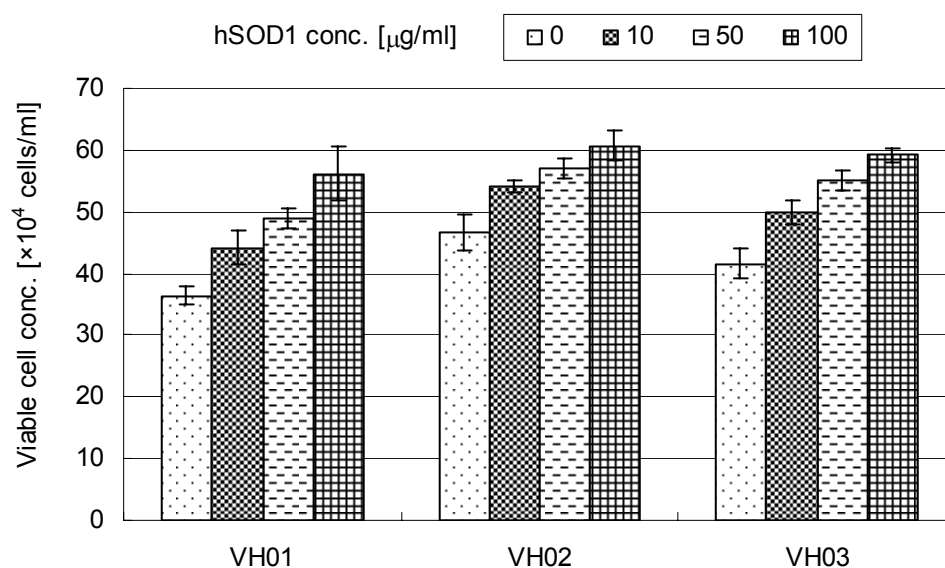


Fig. 6-7 Anti-hSOD1 1st V_H Library から V_H01, V_H02 と V_H03 の抗原依存性細胞増殖

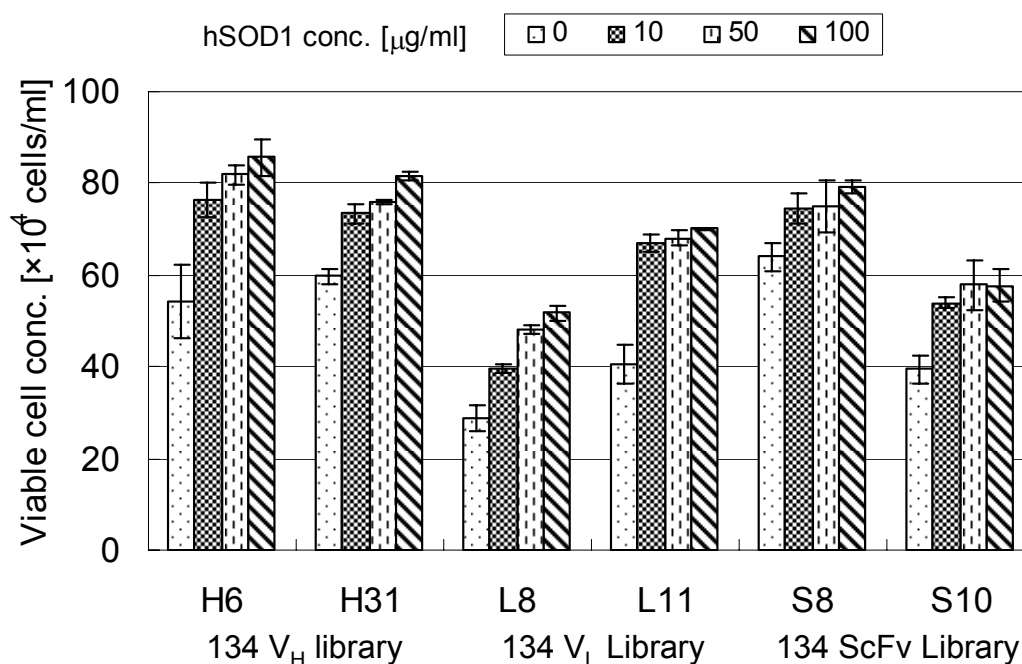


Fig. 6-8 Anti-hSOD1 ♀ 134 V_H, V_L, ScFv Library から得たクローンの抗原依存性細胞増殖

6.3.3. Anti-hSOD1 ♀ 134 Library より取得した細胞集団の細胞表面発現

取得した細胞集団の抗体-受容体キメラとして BaF3 細胞表面での発現を確認するために、4 章で構築した抗体-受容体キメラの細胞表面発現量を測定する時と同じ手法で、取得した細胞集団の細胞表面での発現を確認した。抗体-受容体キメラの N 末端に HA-tag が付いているので、一次抗体として Mouse Anti-HA 抗体を使い、二次抗体として PE 標識した Anti-Mouse IgG 抗体を使った。励起波長が 488 nm, 蛍光検出波長が 585 ± 21 nm の条件で、細胞表面での発現レベルを測定した。結果は Fig. 6-9 に示した。黒いヒストグラムは BaF3 細胞を使って測定した結果であり、ネガティブコントロールとして使った。灰色の線のヒストグラム部分が実際各細胞集団発現細胞を測定した結果である。その結果、細胞集団 H6 の細胞表面発現量がかなり低かった。そのほかの細胞集団については表面発現が確認された。

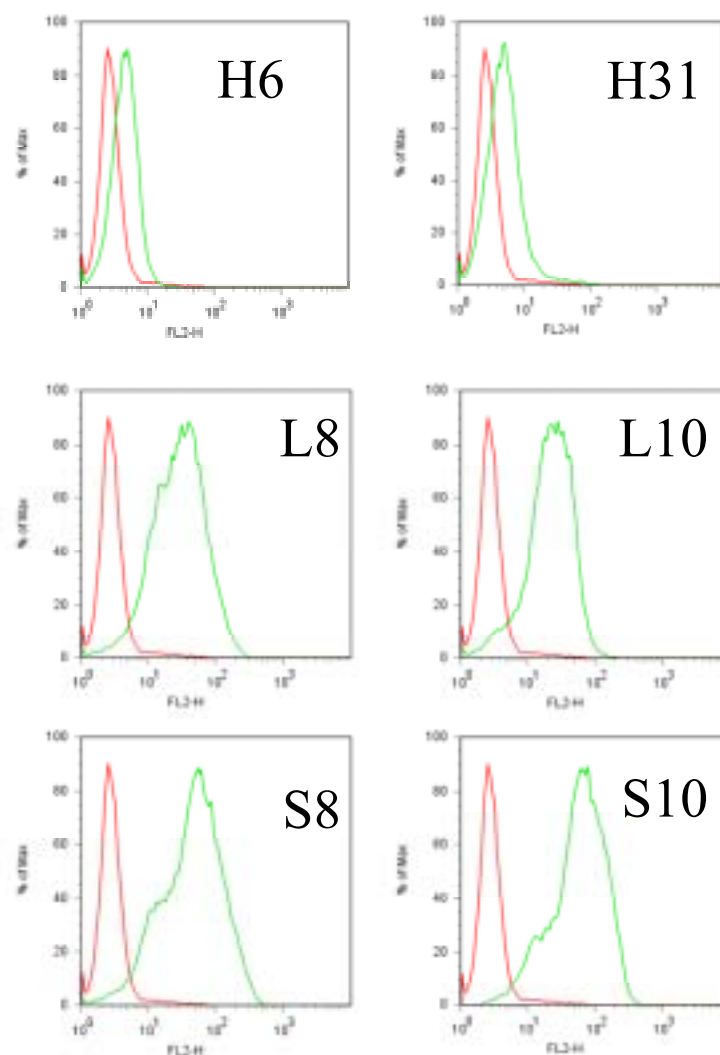


Fig. 6-9 取得したクローンの細胞表面発現レベル

6.3.4. 抗体発現

取得した細胞集団の細胞から GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit によりゲノムを抽出した．抽出したゲノムを Template にして Genomic PCR を行った．Genomic PCR を行う際に，いろいろな Template 濃度を振って，最適 Template 濃度を決めた．その条件で Primer (LibS-gpGenomicPCRFor 5'-GGT TCC ACT GGT GAC TAT CC-3', LibS-gpGenomicPCRRev 5'-CCA CGA GGA TGA GGG AGA GCG -3') と PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara Bio, Kyoto, Japan)により抗体部分を増幅させた．ゲル回収した抗体遺伝子断片を *Sfi*I と *Not*I で処理することにより抗体断片を切り出してインサートとした．これを *Sfi*I と *Not*I サイトを作った SV40 Ori 配列を含むベクターpDisplay に組み込ませて，COS-1 細胞株に遺伝子導入して分泌型抗体を一過性発現させた．発現された抗体の N 末端に HA-tag, C 末端に His-tag がついている．

発現された抗体は細胞培養上清に含まれており，回収した培養上清をそのまま抗体

溶液として使うこともできるが、培地に血清が含まれると、抗体抗原結合における血清の影響が考えられる。また、抗体精製を行う際に血清があると精製が難しくなると考えられる。そこで無血清培地を使用すると、血清による影響を除くことができる。無血清培地により抗体発現効率に対する影響を調べるために、普通の血清入り培地を比較対象にして、数種類の無血清培地を使って抗体発現させた。比較するために、①, DMEM- : 無血清培地 DMEM ; ②, CD : 動物由来成分を含まない完全合成培地 IS CHO-CD™ 無血清培地 (IS Japan, Saitama, Japan) ; ③, CD4 : IS CHO-CD™ 4 無血清培地 (IS Japan, Saitama, Japan) ; ④, ASF104 : ASF104N medium (Ajinomoto, Japan)を使用した。発現された抗体の N 末端に HA-tag, C 末端に His-tag がついているので, Fig. 6-10 に示した Sandwich ELISA 法により, 回収した培養上清に含まれている抗体濃度を比較した (Fig.6-11). それぞれの培地で遺伝子導入なしの COS-1 細胞培養上清を Negative Control として使った。その結果, 無血清培地でも抗体発現に対する影響がないと考えてもよいと考えられた。血清に含まれてあるたんぱく質による ELISA 測定における影響と抗体精製などを考えて, 本研究での COS-1 細胞株を用いた抗体発現では全部無血清培地 ASF104N を使用した。

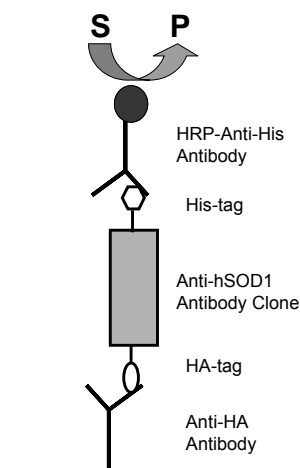


Fig. 6-10 培養上清に含まれてある抗体を検出する Sandwich ELISA 法

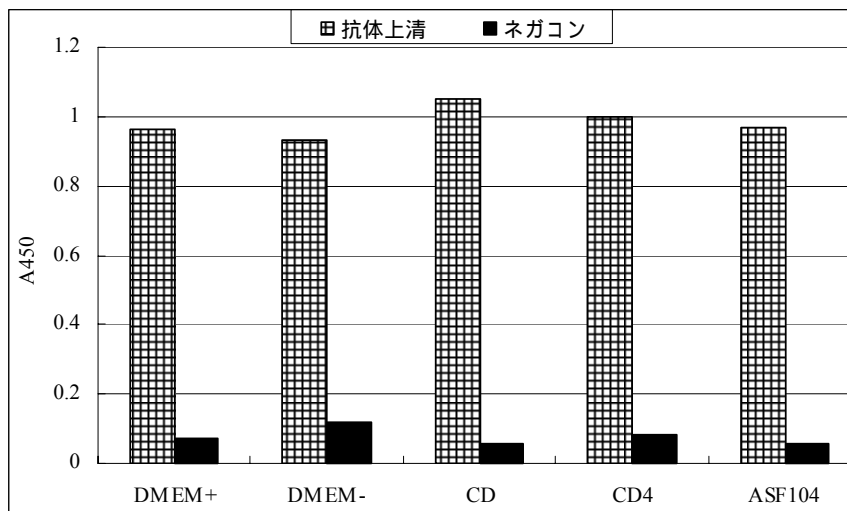


Fig. 6-11 培地により抗体発現に対する影響

6.3.5. 抗体濃縮

抗体発現ベクターを COS-1 細胞株に導入してから 24Hr 後に、無血清培地 ASF104N に培地交換する。培地交換してから 48Hr ごとに、細胞培養上清を回収して抗体溶液として使用した。回収した上清に抗体が含まれているかどうかを Sandwich ELISA で確認した (Fig.6-12)。合計三回培養上清を回収したが、抗体発現ベクターの遺伝子量が同じであり、遺伝子導入操作も同じであったにもかかわらず、クローンにより抗体発現量が違うことが分かった。ScFv として発現された抗体の量は V_H 鎖または V_L 鎖のみの場合より多くなる傾向を示した。これは V_H 鎖または V_L 鎖のみより、ScFv の形として発現されたほうが安定であることが示唆された。

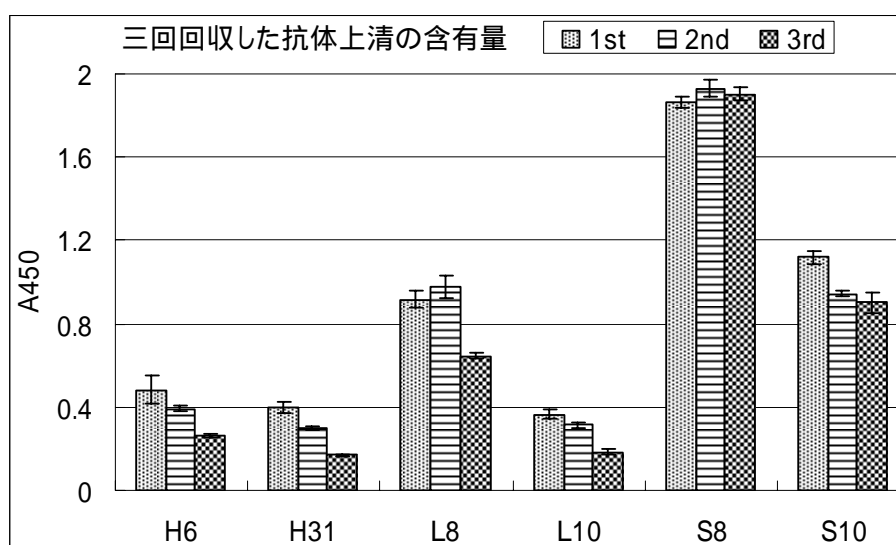


Fig. 6-12 回収した培養上清に含まれている抗体を Sandwich ELISA によって確認した結果

本研究で発現させた抗体の N 末端に HA-tag, C 末端に His-tag がついているので、発現抗体の分子量は ScFv : 28.1 KDa ; V_H : 15.1 KDa ; V_L : 14.0 KDa である。His-tag による抗体精製もできるが、無血清培地を使っているから、単純な限外濾過により培養上清に含まれている抗体を濃縮することもできる。ScFv 抗体の濃縮には Amicon Ultra-15 centrifugal filter (MWCO 10,000, 10-KDa cut-off) (Millipore, MA, USA), V_H 鎖または V_L 鎖のみの抗体の濃縮には Amicon Ultra-15 centrifugal filter (MWCO 3,000, 3-KDa cut-off)を用いた。濃縮した抗体の濃度を決めるために、Sandwich ELISA を行った。結果は Fig. 6-13 に示した。濃縮した抗体の濃度はそれぞれ異なった。

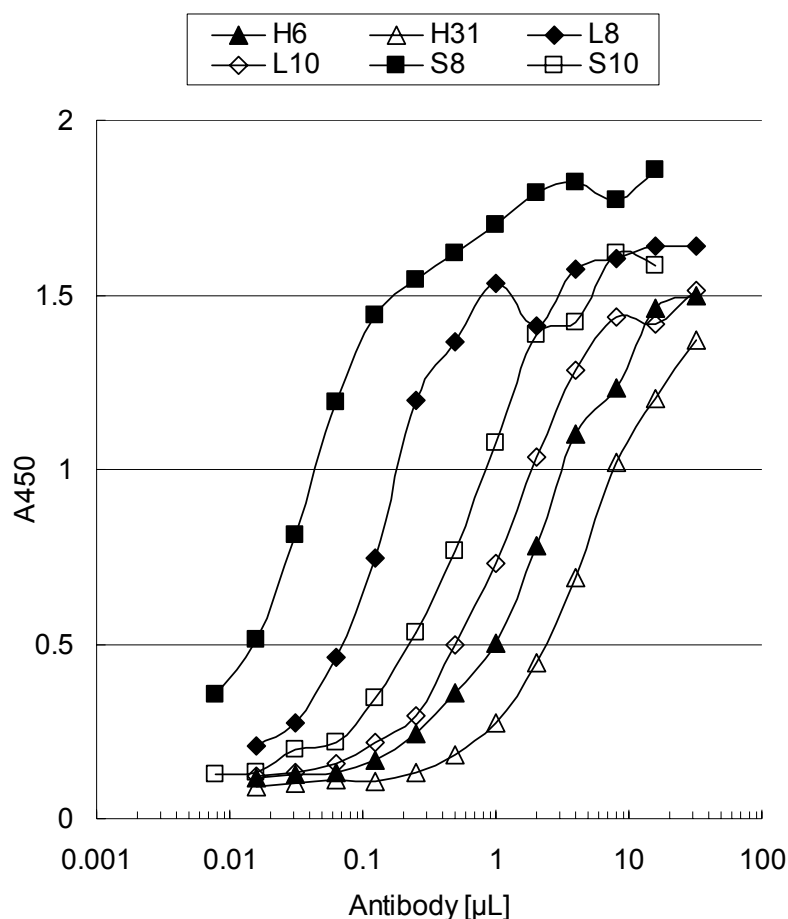


Fig. 6-13 培養上清に含まれている抗体を濃縮し， Sandwich ELISA 法で濃度確認した結果

6.3.6. 抗体 Affinity の ELISA 法による測定

hSOD1 の Greek key loop といわれるエピトープ部分が既往の報告により明らかになった (152-154). ただし， hSOD1 が一つの抗体と結合すると， 二つ目の抗体との結合ができなくなる可能性も考えられる． 取得したクローンの hSOD1 に対する Affinity を評価する際に Sandwich ELISA 法で行うと hSOD1 には少なくとも二つの結合サイトが必要になる． この問題を解決するために， EZ-Link NHS – PEG4 – biotin (Pierce Biotechnology)を使って， hSOD1 の Biotin 化修飾を行った． NHS 基部分はたんぱく質中の Lysine 残基と反応してビオチン化する． 本研究で使用している hSOD1 は， Fig. 6-14 に示したように， Greek key loop (102-SVISLSGDHCHIIGR-116) 部分には K (Lysine) がない． 赤部分： Greek key loop， 黄部分： Lys 残基， Biotin 化される可能性のある部位， 立体構造からみれば Biotin 化による結合障害は低いと考えられた．

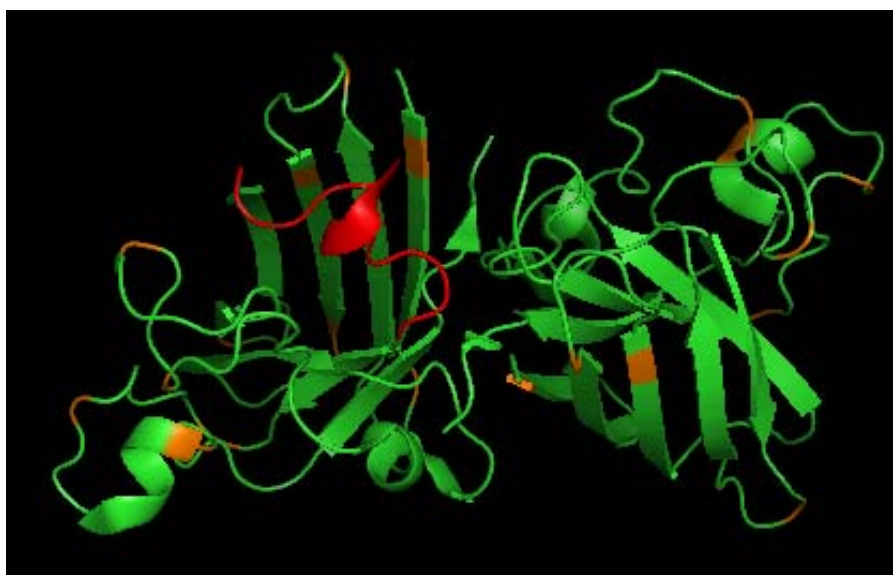


Fig. 6-14 hSOD1 を Biotin 化する．赤部分：Greek key loop，黄部分：Lys 残基

Biotin 化した hSOD1 を使って，Fig. 6-15 に示した Sandwich ELISA 法により取得したクローンの hSOD1 に対する Affinity を評価した．発現した抗体に HA-tag が付いているので，最初に Anti-HA 抗体を Plate に Binding させ，限外濾過により濃縮した抗体溶液を同じ量になるように添加した．その上に Biotin 化した hSOD1 を結合させた．最後に HRP 標識した Streptavidin を結合して，基質発色を行った．結果は Fig. 6-16 に示した．H6 と H31 が V_H 鎖のみの抗体，L8 と L11 が V_L 鎖のみの抗体，S8 と S10 が ScFv 抗体である．それぞれの抗体を含んでいる培養上清を使って，hSOD1 に対する Affinity を評価した結果である．

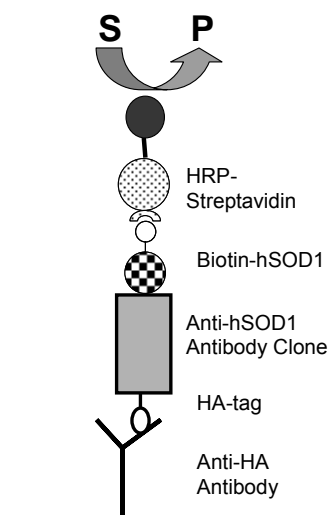


Fig. 6-15 取得したクローンの hSOD1 に対する Affinity を評価する Sandwich ELISA 法

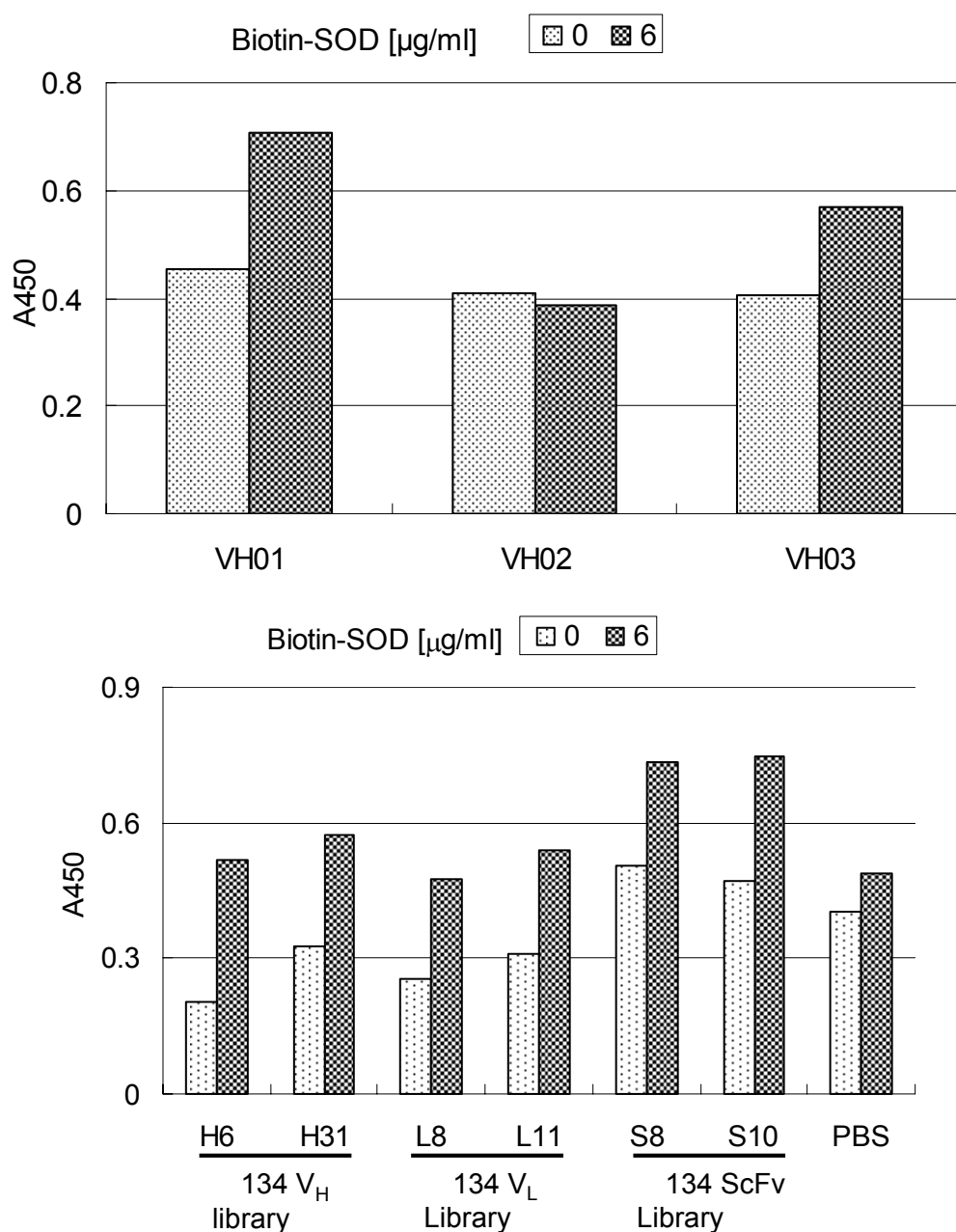


Fig. 6-16 取得したクローンの hSOD1 に対する Affinity

6.3.7. 抗体 Affinity の FACS 法による測定

取得した細胞集団の細胞表面での発現が Fig. 6-9 で確認できた。細胞集団の細胞表面発現レベルを測定する手法と同じような操作で抗体 Affinity を測定した。具体的な操作としては、細胞表面発現レベル測定する時の一次抗体の代わりに Biotin-hSOD1 を使い、二次抗体の代わりに PE 標識した Streptavidin を使った。励起波長が 488 nm、蛍光検出波長が 585 ± 21 nm の条件で測定した。結果は Fig. 6-17 に示した。黒いヒストグラムは BaF3 細胞を使って測定した結果であり、ネガティブコントロールとして使った。灰色の線のヒストグラム部分が実際各細胞集団発現細胞を測定した結果である。その結果、各クローンの Biotin 化した hSOD1 に対する Affinity が確認された。

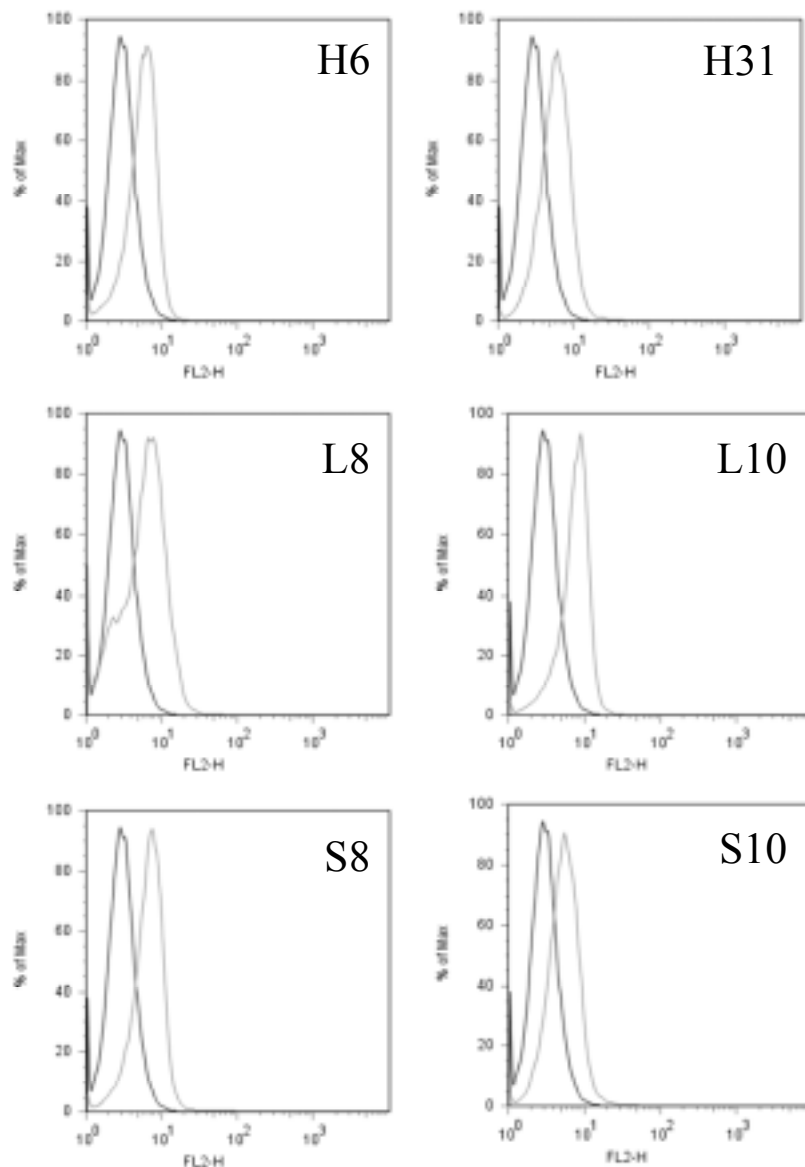


Fig. 6-17 取得したクローンの hSOD1 に対する Affinity を FACS による測定結果

6.3.8. 取得したクローン V_H01, V_H02 と V_H03 の配列分析

取得したクローン V_H01, V_H02 と V_H03 の hSOD1 に対する Affinity を見れば, V_H01 と V_H03 は hSOD1 に対して低い Affinity を有し, V_H02 クローンの Affinity はなかったことが分かった. ライブラリーから得たクローンの遺伝子配列を分析して比較することにより, 抗体にある抗原との結合部位を推測できる. 取得したクローン V_H01, V_H02 と V_H03 の遺伝子配列を分析した. 結果は Fig. 6-18 に示した, A 部分は DNA 配列, B 部分はアミノ酸配列である. 三つのクローンのアミノ酸配列を比較したところ, V_H02 クローンは V_H01 と V_H03 クローンと比べて, CDR3 に数アミノ酸欠如していることが分かった(155). 以上の結果からみれば抗体 CDR3 部分は hSOD1 との結合に大きく関与していることが示唆された.

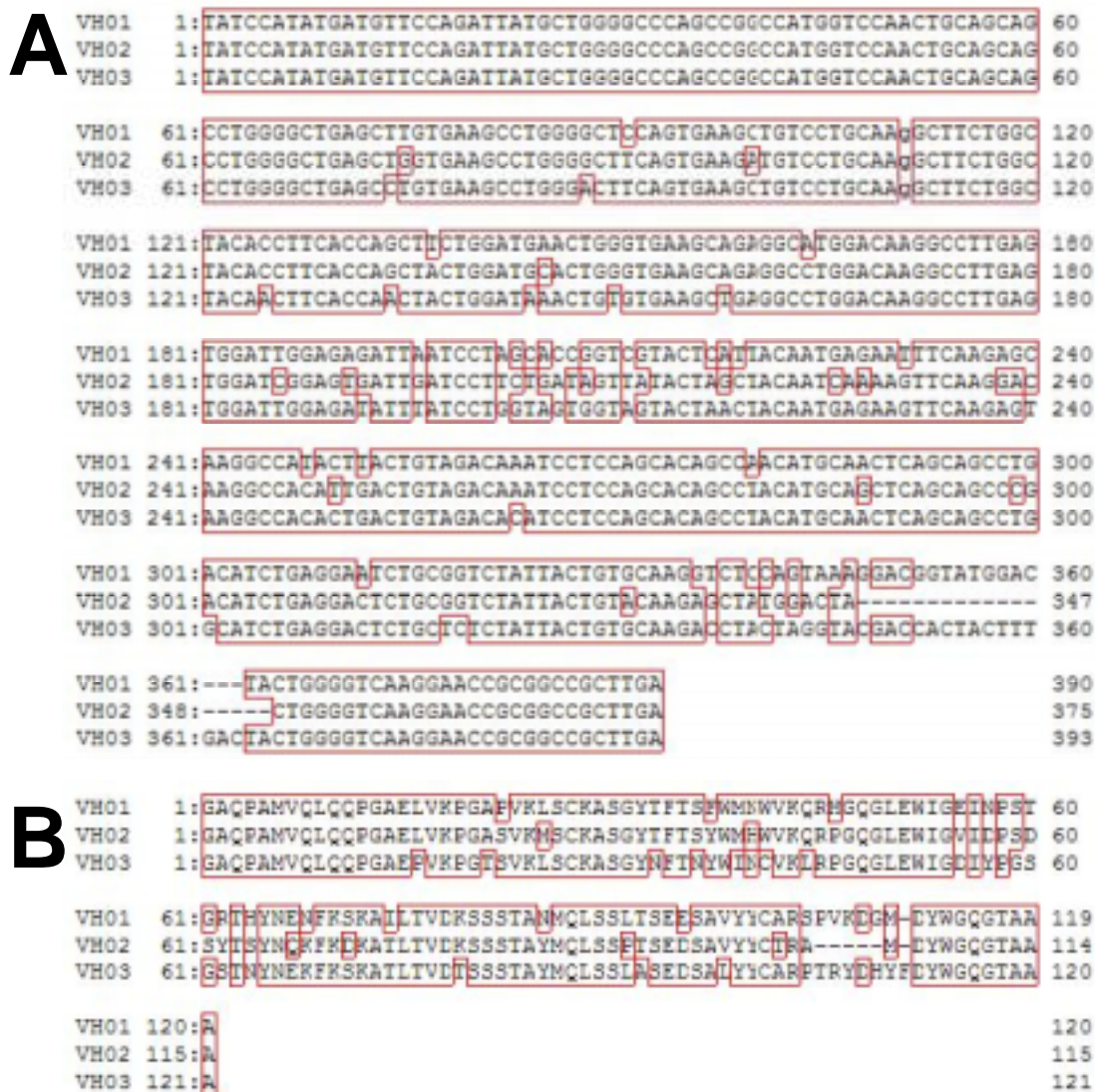


Fig. 6-18 クローン V_H01, V_H02 と V_H03 の DNA 配列(A)とアミノ酸配列(B)の比較

6.4. 考察

Anti-FL ScFv 31IJ3 clone をベースに細胞増殖シグナルの ON/OFF 制御ができた抗体-受容体キメラの ScFv 部分をライブラリー化して、hSOD1 による抗体ライブラリー選択を行った。hSOD1 はダイマーであり、抗体-受容体キメラをダイマー化させることができ、細胞増殖シグナルを伝達すると考えた。モデル系と同じように、細胞表面で発現される抗体-受容体キメラにある抗体部分が添加した hSOD1 に Affinity を持っていないと、細胞増殖シグナルが伝達できなくなって細胞が死滅し、生存した細胞表面に発現された抗体-受容体キメラにある抗体部分は抗原結合性を持っていると予測した。

hSOD1 を使って免疫したマウスの脾臓細胞からトータル RNA を抽出して、RT-PCR により抗体 V_H または V_L 部分のみを増幅して、または増幅された抗体 V_H と V_L 部分を二次 PCR によりリンカーで連結して抗体 ScFv ライブラリーを作製した。作製した抗体ライブラリーを抗体-受容体キメラ Sg の ScFv 部分と置換して、Anti-hSOD1 1st V_H Library,

Anti-hSOD1 φ 134V_H Library, Anti-hSOD1 φ 134 V_L Library と Anti-hSOD1 φ 134 ScFv Library を構築した。Electroporation により大腸菌に導入して抗体ライブラリーPlasmidを増幅させた。本研究で得た抗体-受容体キメラライブラリーサイズは 10^6 オーダーであった。構築した抗体-受容体キメラライブラリーを BaF3 細胞表面に発現させ、そこで抗原 hSOD1 を含んでいる培地を使って細胞培養することにより抗体ライブラリー選択を行った。細胞表面に発現されてある抗体-受容体キメラに融合した V_H 鎖, V_L 鎖または ScFv は抗原である hSOD1 に Affinity がないと、抗原 hSOD1 との結合がなく、その抗体-受容体キメラがダイマー化せず、細胞増殖シグナル伝達もなく、細胞が死滅すると思ったが、実際抗体-受容体ライブラリーを BaF3 細胞に発現すると、殆どの細胞が抗原非依存性細胞増殖を示した。細胞の生死だけによる抗体ライブラリー選択ができなくなってしまった。そこで、増殖してきた細胞集団が抗原に応答して増殖してきたか、または抗原非依存性細胞増殖によるものかを区別するため、回収した細胞集団を対象に抗原である hSOD1 のありなしによる増殖の差を評価した。hSOD1 のありなしによる細胞増殖速度の差を示した細胞集団は抗原に対する Affinity を持っていると考えた。このような簡易的な Growth Assay 法により細胞集団を絞り込んだが、取得した細胞集団はいずれも抗原非依存性細胞増殖による増殖バックグラウンドがあった。原因として考えられるのは、抗体ドメイン同士の相互作用がある可能性が考えられる。

本研究で構築した抗体-受容体キメラライブラリーの N 末端に HA-tag がついており、一次抗体として Mouse Anti-HA、二次抗体として PE 標識した Anti-Mouse IgG 抗体を使うと、励起波長が 488 nm、蛍光検出波長が 585 ± 21 nm の条件で、細胞表面での抗体-受容体キメラ発現レベルを測定できる。取得した細胞集団の細胞表面発現レベルを測定した。ほとんどの細胞集団において細胞表面発現が検出できた。

取得した抗体細胞集団の細胞からゲノムを抽出して、Genomic PCR により抗体断片を増幅した。分泌型抗体を COS-1 細胞株で発現させるために、増幅した抗体遺伝子断片を SV40 Ori 遺伝子を含むベクター pDisplay に組み込ませて、COS-1 細胞株に遺伝子導入して分泌型抗体を一過性発現させた。発現された抗体の N 末端に HA-tag, C 末端に His-tag がついているので、Anti-HA 抗体により分泌された抗体を Plate に固定して、そこで HRP 標識した Anti-His-tag 抗体により検出する Sandwich ELISA 法により、回収した細胞培養上清に含まれている抗体の検出および定量ができる。

同じように、取得した抗体の hSOD1 に対する Affinity を Sandwich ELISA で評価した。また、抗体-受容体キメラの細胞表面発現レベルを測定する手法と同じように、一次抗体が Biotin-hSOD1、二次抗体が PE 標識した Streptavidin を使うことにより、FACS で抗体クローンの抗原 hSOD1 に対する Affinity を測定した。ピークのシフトがあったため、FACS により測定ができたと考える。さらに、Sandwich ELISA 法による測定を行った、hSOD1 に対する Affinity を持っていることが分かった。しかし、いずれも Affinity は非常に低かった。そこで原因として考えられるのは、抗体としては、COS-1 細胞の培養上清を回収して使ったが、抗体濃度が非常に低くて、Sandwich ELISA による Affinity 測定結果も低くなったことである。

7. 結言

本研究では、抗原存在下でのみ増殖シグナル伝達が生じる抗体-受容体キメラを用いて、抗体ライブラリーの中から、任意の抗原に対して、増殖活性を指標として高い結合能を持つ抗体を迅速且つ簡便にスクリーニングする手法を開発することを目指した。抗原がその抗原の抗体とは一対一の結合関係になり、同じように細胞から分泌されるサイトカインもそのカイトカインのレセプターとは一対一の結合関係であるという現象を利用した。サイトカインとサイトカインレセプターの結合部位との *Affinity* により、細胞増殖シグナルが変わることから、サイトカインレセプターの代わりに、細胞表面に抗体を融合した抗体-受容体キメラを発現させ、そこでサイトカインの代わりに抗原を添加する。添加した抗原に対する *Affinity* を持つ抗体を融合した抗体-受容体キメラがダイマー化され、活性化された抗体-受容体キメラが細胞増殖シグナルを伝達して細胞増殖する。抗原に対する *Affinity* のない抗体を融合した抗体-受容体キメラを発現した細胞は死滅する。このような細胞の生死による抗体ライブラリー選択法を開発する。

本研究室においては、以前に構築した抗体-受容体キメラではリガンド非添加での増殖 (*background* 活性) が見られた。そのまま抗体ライブラリー選択すると、抗原非依存性細胞増殖が増えてくると考えられる。細胞の生死によるライブラリー選択ができなくなり、*background* 活性のない抗体-受容体キメラを構築する必要がある。本研究では *EpoR* をベースにして抗体-受容体キメラを構築した。*background* 活性のない抗体-受容体キメラを構築するために、最初に、*EpoR* 細胞外ドメインおよび細胞内ドメインを用いた抗体-受容体キメラにおいて、増殖シグナル伝達に対する影響を調べる必要がある。そのため、3種類の *EpoR* 細胞外ドメイン (*D1* ドメインのみ、*D2* ドメインのみ、*D1* と *D2* 両方) を持つ抗体-受容体キメラを構築した。さらにそれらの抗体-受容体キメラをベースにして、細胞内ドメインの配向性を変えるために、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に *Ala* 残基を挿入した抗体-受容体キメラも構築した。抗原である *BSA-FL* に対する増殖依存性を *Growth Assay* で評価した。さらに、構築した抗体-受容体キメラの細胞外ドメインの異なる部位に結合する複数のリガンドを使った刺激実験を行った。それぞれのリガンド刺激により、抗体-受容体キメラのコンホメーション変化を引き起こし、シグナル伝達に対する影響をシグナル伝達経路にある蛋白質 *JAK2*, *STAT5* と *ERK1/2* のリン酸化状況を調べることにより評価した。その結果、同じリガンドのそれぞれの抗体-受容体キメラにおける刺激効果は大きく異なったことから、抗体-受容体キメラ細胞外ドメインは抗体-受容体キメラの活性に大きな影響を持つことが示唆された。*Ala* 残基の挿入によって抗原応答性細胞増殖が大きく影響されたので、細胞内ドメインの配向性は抗体-受容体キメラの活性に大きな影響を持つことが分かった(121)。本研究で構築した抗体-受容体キメラのそれぞれの部位に結合することにより、抗体-受容体キメラダイマーまたはオリゴマーを誘導して、シグナル伝達経路における蛋白質のリン酸化を調べることによりシグナル伝達メカニズムを解明する手法は、本研究で初めて提唱したものである。この手法を用いれば受容体の活性

化機構の解明などの研究に新しい知見を与えられ.

構築した EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラから得た知見に基づいて, さらに gp130 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラを構築した, その中に, EpoR 細胞外ドメイン D1D2 を共に削除され, ScFv が直接に EpoR 膜貫通ドメインに融合し, gp130 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラ Sg では, 厳密に BSA-FL 依存性細胞増殖の ON/OFF 制御ができた(151).

この研究をさらに進めて, 抗体-受容体キメラ Sg の ScFv 部分をライブラリー化し, 細胞表面に抗体ライブラリー-受容体キメラを発現させて, そこに抗原を添加して増殖する細胞を回収すれば抗体ライブラリー選択ができると考えられる. 本研究で生理的条件下でダイマー状態になる hSOD1 を抗原として使い, hSOD1 を使って免疫したマウスから, Anti-hSOD1 抗体ライブラリー V_H 鎖と V_L 鎖を増幅させ, さらにそれらより ScFv 部分ライブラリーを構築した. 得た抗体ライブラリーを抗原依存的に細胞増殖の ON/OFF 制御のできた抗体-受容体キメラ Sg の ScFv 部分と置換して, Anti-hSOD1 抗体-受容体キメラライブラリーを構築した. 抗体-受容体キメラライブラリーを BaF3 細胞表面で発現させ, hSOD1 を添加して培養した. この研究の最初の設定としては, 投入した抗原である hSOD1 に対する Affinity を持つ抗体断片を融合した抗体-受容体キメラを発現した細胞のみ増殖するが, そのほかの細胞が死滅することであった. 実際に構築した Anti-hSOD1 抗体-受容体キメラライブラリーを発現した BaF3 細胞培養液に抗原である hSOD1 を添加して培養すると, 抗原非応答性増殖による細胞増殖が多かった. そこで増えてきた抗体クローンの中から, 抗原依存性細胞増殖性を示した抗体クローンを選び出した. 取得したクローンの細胞表面での発現は PE 標識した抗体により測定できた. また, 取得したクローンの hSOD1 に対する Affinity も PE 標識した抗体により確認できた. さらに, 取得した抗体クローンの細胞から抗体断片部分を増幅して, COS-1 細胞を用いて抗体を発現させ, hSOD1 に対する結合性を Sandwich ELISA で評価した. いくつかのクローンにおいて hSOD1 に対する結合性が示唆された. 本研究では抗体可変領域 Fv が抗原存在下で安定な複合体を作ることと, 受容体が二量体を形成して増殖シグナルを伝達するという性質を利用し, 目的蛋白質に対する抗体 Fv を膜表示している細胞だけを短時間にスクリーニングできる系を開発できる可能性が示唆された.

本研究の最初の設定とは違い, 抗原依存性細胞増殖を厳密に ON/OFF 制御できた抗体-受容体キメラ Sg を用いて構築した抗体-受容体キメラライブラリーから, 抗原非依存性により増殖した細胞クローンがほとんどであった. その原因としては考えたのは, 厳格な抗原 BSA-FL に対する依存性を示した抗体-受容体キメラ Sg(151)では抗体 ScFv を用いて構築された. それに対して, Anti-hSOD1 1st V_H Library, Anti-hSOD1 ♀ 134V_H Library または Anti-hSOD1 ♀ 134 V_L Library では, 単独な抗体 V_H 鎖 または V_L 鎖を用いて構築された. 単独な抗体 V_H 鎖 または V_L 鎖に関する研究では, ベンスジョーンズタンパク質に関する研究が多く存在する. ベンスジョーンズタンパク質とは免疫に関与する γ-グロブリンというタンパク質の破片であり, 多発性骨髄腫という血液のがんで上昇する

たんぱく質である。そのベンスジョーンズタンパク質では V_L - V_H 鎖ダイマーのように V_L - V_L 鎖ダイマーが形成され、それは病気の原因になると考えられる(156)。または、85% アミロイド症患者ではフリー状態の抗体 V_L 鎖が分泌され、それにより V_L - V_L 鎖ダイマーが形成される(157)。そのほかに V_H - V_H 鎖ダイマーに関する研究も多数あった(158-160)。それらの研究報告により、 V_H 鎖または V_L 鎖同士によりダイマー化になる可能性が示唆された。構築された単独な抗体 V_H 鎖 または V_L 鎖を融合した抗体-受容体キメラには V_L - V_L または V_H - V_H ダイマーが形成され、抗原非依存性細胞増殖につながったと考えられる。抗原依存性細胞増殖を厳密に ON/OFF 制御できる抗体-受容体キメラを構築するには、モデルとして Anti-FL ScFv を使用したが、使った ScFv がヒト ScFv であった。実際に抗体-受容体キメラライブラリーを構築するにはマウス ScFv を用いた。最適化抗体-受容体キメラを構築する過程の中でほかに抗原非依存性細胞増殖を示した抗体-受容体キメラも多数があった。ヒト ScFv を用いて最適化した抗体-受容体キメラにある ScFv をマウス ScFv に置換すると、その差により、抗原非依存性細胞増殖になる可能性があり、実際抗体ライブラリーで最適化した抗体-受容体キメラ Sg の ScFv を置換すると、マウス ScFv 同士の間でダイマーが生じ、細胞増殖シグナルを伝達するようになったと考えられる。その問題を解決するには、マウス ScFv を用いて、抗原依存性細胞増殖を厳密に ON/OFF 制御できる抗体-受容体キメラを最適化する必要がある。

本研究で使った抗原は hSOD1 であったが hSOD1 の BaF3 細胞に対する細胞毒性があった。抗原である hSOD1 に対する抗原依存性細胞増殖を評価する際に、抗原の細胞毒性による影響が無視できないので、評価結果に対する影響があると考えられる。

8. 発表状況

8.1. 学術雑誌等（紀要論文集等も含む）に発表した論文

- 1, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2008) Construction of a fluorescein - responsive chimeric receptor with strict ligand dependency, *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 975-984
- 2, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2008) Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency and analysis of the role of erythropoietin receptor domains in signal transduction, *Animal Cell Culture and Production of Biologicals (Proceedings of JAACT'2006)*, Ed. by K. Ikura et al. Kluwer Acad. Pub., Dordrecht, pp.197-203.
- 3, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2009) The influence of domain structures on the signal transduction of chimeric receptors derived from the erythropoietin receptor. *J. Biochem.* (Tokyo) In press **doi:10.1093/jb/mvp013**
- 4, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2008) The characteristic of chimeric receptors based on Erythropoietin receptor, *Animal Cell Culture and Production of Biologicals (Proceedings of JAACT'2008)*, In press.

8.2. 国際会議におけるポスター発表

- 1, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency, 『China/USA/Japan Joint Chemical Engineering Conference』, P06-18, BeJing, China, (October 2005)
- 2, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency and analyses role of erythropoietin receptor domains in signal transduction, 『4th COE 21 International Symposium』, P-96, Tokyo, Japan (October 2006)
- 3, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. The Signal Transduction of Chimeric Receptors Based on Erythropoietin Receptor, 『The 2nd International Workshop on Approaches to Signal-Cell Analysis』, E-11, Tokyo, Japan (September 2007)
- 4, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. 「The Influence of Domain and Conformation Change to the Signal Transduction of Chimeric Receptors Based on Erythropoietin Receptor」, 『The 13th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community』, PP-55, Seoul, Korea (October 2007)
- 5, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. 「The characteristic of chimeric receptors based on Erythropoietin receptor」, 『The 21th International and Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology』, P-80, Fukuoka, Japan (November 2008)

8.3. 国際会議における口頭発表

- 1, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. 「 Construction of a

fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency and analysis of the role of erythropoietin receptor domains in signal transduction」, 『The 19th International and Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology』, O-21, Kyoto, Japan (September 2006)

8.4. 国内学会, シンポジウム等におけるポスター発表

- 1, 劉文海, 河原正浩, 上田宏, 長棟輝行 「Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency—— For establishing a novel method to select high-affinity antibody against any antigen」, 『第6回 創薬工学シンポジウム』, P-18, 東京 2006年12月
- 2, 劉文海, 河原正浩, 上田宏, 長棟輝行 「厳密にリガンド依存性を持つフルオセレイン応答性抗体-受容体キメラの構築」, 『東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム』, PB-039, 東京 2006年11月
- 3, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. 「The Influence of Domain and Conformation Change to the Signal Transduction of Chimeric Receptors Based on Erythropoietin Receptor 」, BMB2007 Biochemistry and Molecular Biology, 2P-0232, Yokohama, Japan 2007年11月

8.5. 学会, シンポジウム等における口頭発表

- 1, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. 「A fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency」, 『The 78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society』, 4P-552, Kobe, Japan 2005年10月
- 2, Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. 「The Influence of Domain and Conformation Change to the Signal Transduction of Chimeric Receptors Based on Erythropoietin Receptor 」, BMB2007 Biochemistry and Molecular Biology, 1T15-10, Yokohama, Japan 2007年11月

9. 参考文献

1. Fairlie, W.D., Uboldi, A.D., McCoubrie, J.E., Wang, C.C., Lee, E.F., Yao, S., De Souza, D.P., Mifsud, S., Metcalf, D., Nicola, N.A., Norton, R.S., and Baca, M. (2004) Affinity maturation of leukemia inhibitory factor and conversion to potent antagonists of signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 2125-2134
2. Kawahara, M., Ueda, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., Mahoney, W., and Nagamune, T. (2001) A growth signal with an artificially induced erythropoietin receptor-gp130 cytoplasmic domain heterodimer. *J. Biochem.* **130**, 305-312
3. Ueda, H., Kawahara, M., Aburatani, T., Tsumoto, K., Todokoro, K., Suzuki, E., Nishimura, H., Schueler, P.A., Winter, G., Mahoney, W.C., Kumagai, I., and Nagamune, T. (2000) Cell-growth control by monomeric antigen: the cell surface expression of lysozyme-specific Ig V-domains fused to truncated Epo receptor. *J. Immunol. Methods* **241**, 159-170
4. Kawahara, M., Natsume, A., Terada, S., Kato, K., Tsumoto, K., Kumagai, I., Miki, M., Mahoney, W., Ueda, H., and Nagamune, T. (2001) Replacing factor-dependency with that for lysozyme: affordable culture of IL-6-dependent hybridoma by transfecting artificial cell surface receptor. *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 416-423
5. Kawahara, M., Kimura, H., Ueda, H., and Nagamune, T. (2004) Selection of genetically modified cell population using hapten-specific antibody/receptor chimera. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 132-138
6. Constantinescu, S.N., Huang, L.J., Nam, H., and Lodish, H.F. (2001) The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Mol. Cell* **7**, 377-385
7. Nathan, C., and Sporn, M. (1991) Cytokines in context. *J. Cell Biol.* **113**, 981-986
8. 山崎正利 (1999) サイトカインの秘密.
9. He, Y.W., Adkins, B., Furse, R.K., and Malek, T.R. (1995) Expression and function of the gamma c subunit of the IL-2, IL-4, and IL-7 receptors. Distinct interaction of gamma c in the IL-4 receptor. *J. Immunol.* **154**, 1596-1605
10. Stomski, F.C., Woodcock, J.M., Zacharakis, B., Bagley, C.J., Sun, Q., and Lopez, A.F. (1998) Identification of a Cys motif in the common beta chain of the interleukin 3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 5 receptors essential for disulfide-linked receptor heterodimerization and activation of all three receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 1192-1199
11. Dumoutier, L., Lejeune, D., Hor, S., Fickenscher, H., and Renauld, J.C. (2003) Cloning of a new type II cytokine receptor activating signal transducer and activator of transcription (STAT)1, STAT2 and STAT3. *Biochem. J.* **370**, 391-396
12. Xu, W., Presnell, S.R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z.,

- Dillon, S.R., Gao, Z., Gilbert, T., Madden, K., Schlutsmeier, S., Yao, L., Whitmore, T.E., Chandrasekhar, Y., Grant, F.J., Maurer, M., Jelinek, L., Storey, H., Brender, T., Hammond, A., Topouzis, S., Clegg, C.H., and Foster, D.C. (2001) A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9511-9516
13. Derynck, R., and Feng, X.H. (1997) TGF-beta receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**, F105-150
 14. Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 145-176
 15. Leonard, W.J., and Lin, J.X. (2000) Cytokine receptor signaling pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 877-888
 16. Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., and Stark, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421
 17. Darnell, J.E., Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-1635
 18. Ihle, J.N. (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* **84**, 331-334
 19. Leonard, W.J., and O'Shea, J.J. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 293-322
 20. Horvath, C.M., and Darnell, J.E. (1997) The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 233-239
 21. Rubinfeld, H., and Seger, R. (2005) The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol. Biotechnol.* **31**, 151-174
 22. Yoon, S., and Seger, R. (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44
 23. Reddy, K.B., Nabha, S.M., and Atanaskova, N. (2003) Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 395-403
 24. Panka, D.J., Atkins, M.B., and Mier, J.W. (2006) Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 2371s-2375s
 25. Kohno, M., and Pouyssegur, J. (2006) Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann. Med.* **38**, 200-211
 26. Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* **346 Pt 3**, 561-576
 27. Altomare, D.A., and Testa, J.R. (2005) Perturbations of the AKT signaling

- pathway in human cancer. *Oncogene* **24**, 7455-7464
28. Kumar, C.C., and Madison, V. (2005) AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**, 7493-7501
 29. Lindenmann, J. (1984) Origin of the terms 'antibody' and 'antigen'. *Scand. J. Immunol.* **19**, 281-285
 30. Gottlieb, P.D., Cunningham, B.A., Rutishauser, U., and Edelman, G.M. (1970) The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. VI. Amino acid sequence of the light chain. *Biochemistry (Mosc.)* **9**, 3155-3161
 31. Edelman, G.M., and Poulik, M.D. (1961) Studies on structural units of the gamma-globulins. *J. Exp. Med.* **113**, 861-884
 32. Kirby, S., Walton, W., and Smithies, O. (2000) Hematopoietic stem cells with controllable tEpoR transgenes have a competitive advantage in bone marrow transplantation. *Blood* **95**, 3710-3715
 33. Kirby, S.L., Cook, D.N., Walton, W., and Smithies, O. (1996) Proliferation of multipotent hematopoietic cells controlled by a truncated erythropoietin receptor transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9402-9407
 34. Blau, C.A., Peterson, K.R., Drachman, J.G., and Spencer, D.M. (1997) A proliferation switch for genetically modified cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3076-3081
 35. Jin, L., Asano, H., and Blau, C.A. (1998) Stimulating cell proliferation through the pharmacologic activation of c-kit. *Blood* **91**, 890-897
 36. Jin, L., Siritanaratkul, N., Emery, D.W., Richard, R.E., Kaushansky, K., Papayannopoulou, T., and Blau, C.A. (1998) Targeted expansion of genetically modified bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8093-8097
 37. Ito, K., Ueda, Y., Kokubun, M., Urabe, M., Inaba, T., Mano, H., Hamada, H., Kitamura, T., Mizoguchi, H., Sakata, T., Hasegawa, M., and Ozawa, K. (1997) Development of a novel selective amplifier gene for controllable expansion of transduced hematopoietic cells. *Blood* **90**, 3884-3892
 38. Kume, A., Ito, K., Ueda, Y., Hasegawa, M., Urabe, M., Mano, H., and Ozawa, K. (1999) A G-CSF receptor-tyrosine kinase B fusion gene: A new type of molecular switch for expansion of genetically modified hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 9-12
 39. Ueda, H., Kikuchi, M., Yagi, S., and Nishimura, H. (1992) Antigen responsive antibody-receptor kinase chimera. *Biotechnology (N. Y.)* **10**, 430-433
 40. Kawahara, M., Ueda, H., Tsumoto, K., Kumagai, I., and Nagamune, T. (2004) AMEGA: antigen-mediated genetically modified cell amplification. *J. Immunol. Methods* **284**, 187-194
 41. Hoogenboom, H.R. (1997) Designing and optimizing library selection strategies for

- generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* **15**, 62-70
42. Hanes, J., and Pluckthun, A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4937-4942
 43. Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., and Roos, R.P. (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* **261**, 1047-1051
 44. Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., and Cleveland, D.W. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* **281**, 1851-1854
 45. Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., Scott, R.W., and Snider, W.D. (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* **13**, 43-47
 46. Mills, C., Makwana, M., Wallace, A., Benn, S., Schmidt, H., Tegeder, I., Costigan, M., Brown, R.H., Jr., Raivich, G., and Woolf, C.J. (2008) Ro5-4864 promotes neonatal motor neuron survival and nerve regeneration in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 937-946
 47. Isaacs, J.D., Dean, A.F., Shaw, C.E., Al-Chalabi, A., Mills, K.R., and Leigh, P.N. (2007) Amyotrophic lateral sclerosis with sensory neuropathy: part of a multisystem disorder? *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry* **78**, 750-753
 48. Palacios, R., and Steinmetz, M. (1985) Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* **41**, 727-734
 49. Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000) Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* **7**, 1063-1066
 50. Onishi, M., Kinoshita, S., Morikawa, Y., Shibuya, A., Phillips, J., Lanier, L.L., Gorman, D.M., Nolan, G.P., Miyajima, A., and Kitamura, T. (1996) Applications of retrovirus-mediated expression cloning. *Exp. Hematol.* **24**, 324-329
 51. Miller, A.D., and Rosman, G.J. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **7**, 980-982, 984-986, 989-990
 52. Jiang, H., Tang, B., Xia, K., Hu, Z., Shen, L., Tang, J., Zhao, G., Zhang, Y., Cai, F., Pan, Q., Long, Z., Wang, G., and Dai, H. (2006) Mutation analysis of the ATM gene in two Chinese patients with ataxia telangiectasia. *J. Neurol. Sci.* **241**, 1-6
 53. Jiang, Y., Lo, W., Akhmametyeva, E.M., and Chang, L.S. (2006) Over-expression of p73beta results in apoptotic death of post-mitotic hNT neurons. *J. Neurol. Sci.* **240**, 1-6

54. Ghattas, I.R., Sanes, J.R., and Majors, J.E. (1991) The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol. Cell. Biochem.* **11**, 5848-5859
55. Jensen, F.C., Girardi, A.J., Gilden, R.V., and Koprowski, H. (1964) Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 53-59
56. Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182
57. Wagemaker, G., Burger, H., van Gils, F.C., van Leen, R.W., and Wielenga, J.J. (1990) Interleukin-3. *Biotherapy* **2**, 337-345
58. Agis, H., Fureder, W., Bankl, H.C., Kundi, M., Sperr, W.R., Willheim, M., Boltz-Nitulescu, G., Butterfield, J.H., Kishi, K., Lechner, K., and Valent, P. (1996) Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology* **87**, 535-543
59. Baghestanian, M., Bankl, H., Sillaber, C., Beil, W.J., Radaszkiewicz, T., Fureder, W., Preiser, J., Vesely, M., Scherthaner, G., Lechner, K., and Valent, P. (1996) A case of malignant mastocytosis with circulating mast cell precursors: biologic and phenotypic characterization of the malignant clone. *Leukemia* **10**, 159-166
60. Miyajima, A., Mui, A.L., Ogorochi, T., and Sakamaki, K. (1993) Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood* **82**, 1960-1974
61. Lin, F.K., Lin, C.H., Lai, P.H., Browne, J.K., Egrie, J.C., Smalling, R., Fox, G.M., Chen, K.K., Castro, M., and Suggs, S. (1986) Monkey erythropoietin gene: cloning, expression and comparison with the human erythropoietin gene. *Gene* **44**, 201-209
62. Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., and et al. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7580-7584
63. Shoemaker, C.B., and Mitsock, L.D. (1986) Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 849-858
64. Wu, H., Klingmuller, U., Acurio, A., Hsiao, J.G., and Lodish, H.F. (1997) Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1806-1810
65. Constantinescu, S.N., Ghaffari, S., and Lodish, H.F. (1999) The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol. Metab.* **10**, 18-23
66. Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. (1999) Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin

- receptor before ligand activation. *Science* **283**, 987-990
67. Syed, R.S., Reid, S.W., Li, C., Cheetham, J.C., Aoki, K.H., Liu, B., Zhan, H., Osslund, T.D., Chirino, A.J., Zhang, J., Finer-Moore, J., Elliott, S., Sitney, K., Katz, B.A., Matthews, D.J., Wendoloski, J.J., Egrie, J., and Stroud, R.M. (1998) Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* **395**, 511-516
 68. Remy, I., Wilson, I.A., and Michnick, S.W. (1999) Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**, 990-993
 69. Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* **334**, 297-314
 70. Muller-Newen, G., Kuster, A., Wijdenes, J., Schaper, F., and Heinrich, P.C. (2000) Studies on the interleukin-6-type cytokine signal transducer gp130 reveal a novel mechanism of receptor activation by monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **275**, 4579-4586
 71. Bravo, J., Staunton, D., Heath, J.K., and Jones, E.Y. (1998) Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *EMBO J.* **17**, 1665-1674
 72. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149-1157
 73. von-Baeyer, A. (1871) Uber ein neue Klasse von Farbstoffen. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **4**, 555
 74. Urano, Y., Kamiya, M., Kanda, K., Ueno, T., Hirose, K., and Nagano, T. (2005) Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4888-4894
 75. Lopatin, D.E., and Voss, E.W., Jr. (1971) Fluorescein. Hapten and antibody active-site probe. *Biochemistry (Mosc.)* **10**, 208-213
 76. Whitlow, M., Howard, A.J., Wood, J.F., Voss, E.W., Jr., and Hardman, K.D. (1995) 1.85 Å structure of anti-fluorescein 4-4-20 Fab. *Protein Eng.* **8**, 749-761
 77. Schwesinger, F., Ros, R., Strunz, T., Anselmetti, D., Guntherodt, H.J., Honegger, A., Jermutus, L., Tiefenauer, L., and Pluckthun, A. (2000) Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9972-9977
 78. Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239
 79. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*

111, 229-233

80. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805
81. Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12501-12504
82. Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664
83. Long, Q., Meng, A., Wang, H., Jessen, J.R., Farrell, M.J., and Lin, S. (1997) GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development* **124**, 4105-4111
84. Jacobi, C.A., Roggenkamp, A., Rakin, A., Zumbihl, R., Leitritz, L., and Heesemann, J. (1998) In vitro and in vivo expression studies of yopE from *Yersinia enterocolitica* using the gfp reporter gene. *Mol. Microbiol.* **30**, 865-882
85. Puget, K., and Michelson, A.M. (1974) Isolation of a new copper-containing superoxide dismutase bacteriocuprein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 830-838
86. Steinman, H.M., and Ely, B. (1990) Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus*: cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J. Bacteriol.* **172**, 2901-2910
87. Loeffler, G., Petrides, P.E., and Heinrich, P.C. (1999) *Biochemie Und Pathobiochemie*, Vol. 8, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K.
88. Al-Chalabi, A., and Leigh, P.N. (2000) Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* **13**, 397-405
89. Conwit, R.A. (2006) Preventing familial ALS: a clinical trial may be feasible but is an efficacy trial warranted? *J. Neurol. Sci.* **251**, 1-2
90. Bowling, A.C., Barkowski, E.E., McKenna-Yasek, D., Sapp, P., Horvitz, H.R., Beal, M.F., and Brown, R.H., Jr. (1995) Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **64**, 2366-2369
91. Phillips, J.P., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Boulianne, G.L., Kirby, K., and Hilliker, A.J. (1995) Subunit-destabilizing mutations in *Drosophila* copper/zinc superoxide dismutase: neuropathology and a model of dimer dysequilibrium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8574-8578
92. D'Andrea, A.D., Fasman, G.D., and Lodish, H.F. (1989) Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor beta chain: a new receptor family. *Cell* **58**, 1023-1024
93. Arcasoy, M.O., Amin, K., Karayal, A.F., Chou, S.C., Raleigh, J.A., Varia, M.A., and Haroon, Z.A. (2002) Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab. Invest.* **82**, 911-918

94. Dagnon, K., Pacary, E., Commo, F., Antoine, M., Bernaudin, M., Bernaudin, J.F., and Callard, P. (2005) Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in non-small cell lung carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **11**, 993-999
95. Leo, C., Horn, L.C., Rauscher, C., Hentschel, B., Liebmann, A., Hildebrandt, G., and Hockel, M. (2006) Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6894-6900
96. Sinclair, A.M., Todd, M.D., Forsythe, K., Knox, S.J., Elliott, S., and Begley, C.G. (2007) Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients. *Cancer* **110**, 477-488
97. Henke, M., Mattern, D., Pepe, M., Bezay, C., Weissenberger, C., Werner, M., and Pajonk, F. (2006) Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings? *J. Clin. Oncol.* **24**, 4708-4713
98. Della Ragione, F., Cucciolla, V., Borriello, A., Oliva, A., and Perrotta, S. (2007) Erythropoietin receptors on cancer cells: a still open question. *J. Clin. Oncol.* **25**, 1812-1813; author reply 1815
99. Leyland-Jones, B., Semiglazov, V., Pawlicki, M., Pienkowski, T., Tjulandin, S., Manikhas, G., Makhson, A., Roth, A., Dodwell, D., Baselga, J., Biakhov, M., Valuckas, K., Voznyi, E., Liu, X., and Vercammen, E. (2005) Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5960-5972
100. Henke, M., Laszig, R., Rube, C., Schafer, U., Haase, K.D., Schilcher, B., Mose, S., Beer, K.T., Burger, U., Dougherty, C., and Frommhold, H. (2003) Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **362**, 1255-1260
101. Watowich, S.S., Wu, H., Socolovsky, M., Klingmuller, U., Constantinescu, S.N., and Lodish, H.F. (1996) Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 91-128
102. Constantinescu, S.N., Liu, X., Beyer, W., Fallon, A., Shekar, S., Henis, Y.I., Smith, S.O., and Lodish, H.F. (1999) Activation of the erythropoietin receptor by the gp55-P viral envelope protein is determined by a single amino acid in its transmembrane domain. *EMBO J.* **18**, 3334-3347
103. Kubatzky, K.F., Ruan, W., Gurezka, R., Cohen, J., Ketteler, R., Watowich, S.S., Neumann, D., Langosch, D., and Klingmuller, U. (2001) Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr. Biol.* **11**, 110-115

104. Constantinescu, S.N., Keren, T., Socolovsky, M., Nam, H., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (2001) Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4379-4384
105. Gurezka, R., Laage, R., Brosig, B., and Langosch, D. (1999) A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments. *J. Biol. Chem.* **274**, 9265-9270
106. Livnah, O., Johnson, D.L., Stura, E.A., Farrell, F.X., Barbone, F.P., You, Y., Liu, K.D., Goldsmith, M.A., He, W., Krause, C.D., Pestka, S., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. (1998) An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 993-991004
107. Livnah, O., Stura, E.A., Johnson, D.L., Middleton, S.A., Mulcahy, L.S., Wrighton, N.C., Dower, W.J., Jolliffe, L.K., and Wilson, I.A. (1996) Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science* **273**, 464-471
108. Greiser, J.S., Stross, C., Heinrich, P.C., Behrmann, I., and Hermanns, H.M. (2002) Orientational constraints of the gp130 intracellular juxtamembrane domain for signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 26959-26965
109. Spaargaren, M., Defize, L.H., Boonstra, J., and de Laat, S.W. (1991) Antibody-induced dimerization activates the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **266**, 1733-1739
110. Kawahara, M., Ogo, Y., Ueda, H., and Nagamune, T. (2004) Improved growth response of antibody/receptor chimera attained by the engineering of transmembrane domain. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 715-719
111. Gorman, C.M., Merlino, G.T., Willingham, M.C., Pastan, I., and Howard, B.H. (1982) The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6777-6781
112. D'Andrea, A.D., and Zon, L.I. (1990) Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J. Clin. Invest.* **86**, 681-687
113. Yoshimura, A., D'Andrea, A.D., and Lodish, H.F. (1990) Friend spleen focus-forming virus glycoprotein gp55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and affects receptor metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4139-4143
114. Neumann, D., Wikstrom, L., Watowich, S.S., and Lodish, H.F. (1993) Intermediates in degradation of the erythropoietin receptor accumulate and are degraded in lysosomes. *J. Biol. Chem.* **268**, 13639-13649
115. Neumann, D., Yuk, M.H., Lodish, H.F., and Lederkremer, G.Z. (1996) Blocking

- intracellular degradation of the erythropoietin and asialoglycoprotein receptors by calpain inhibitors does not result in the same increase in the levels of their membrane and secreted forms. *Biochem. J.* **313**, 391-399
116. Supino-Rosin, L., Yoshimura, A., Altaratz, H., and Neumann, D. (1999) A cytosolic domain of the erythropoietin receptor contributes to endoplasmic reticulum-associated degradation. *Eur. J. Biochem.* **263**, 410-419
 117. Baumgartner, J.W., Wells, C.A., Chen, C.M., and Waters, M.J. (1994) The role of the WSXWS equivalent motif in growth hormone receptor function. *J. Biol. Chem.* **269**, 29094-29101
 118. Druhan, L.J., Ai, J., Massullo, P., Kindwall-Keller, T., Ranalli, M.A., and Avalos, B.R. (2005) Novel mechanism of G-CSF refractoriness in patients with severe congenital neutropenia. *Blood* **105**, 584-591
 119. Ketteler, R., Heinrich, A.C., Offe, J.K., Becker, V., Cohen, J., Neumann, D., and Klingmuller, U. (2002) A functional green fluorescent protein-erythropoietin receptor despite physical separation of JAK2 binding site and tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* **277**, 26547-26552
 120. Schimmenti, L.A., Blechert, G., Harris, K.W., and Winkelmann, J.C. (1995) Localization of an essential ligand binding determinant of the human erythropoietin receptor to a domain N-terminal to the WSXWS motif: implications for soluble receptor function. *Exp. Hematol.* **23**, 1341-1346
 121. Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2009) The influence of domain structures on the signal transduction of chimeric receptors derived from the erythropoietin receptor. *J. Biochem. (Tokyo)* **In press** doi:10.1093/jb/mvp013
 122. Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993) IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* **260**, 1808-1810
 123. Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. (1993) LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* **260**, 1805-1808
 124. Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* **11**, 69-74
 125. Luttkien, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T., and et al. (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* **263**, 89-92
 126. Stahl, N., Boulton, T.G., Farruggella, T., Ip, N.Y., Davis, S., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., and et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor

- components. *Science* **263**, 92-95
127. Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr., and Yancopoulos, G.D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* **267**, 1349-1353
 128. Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T., and Taga, T. (1994) Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2285-2289
 129. Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J.E., Jr. (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**, 95-98
 130. Nakajima, K., Yamanaka, Y., Nakae, K., Kojima, H., Ichiba, M., Kiuchi, N., Kitaoka, T., Fukada, T., Hibi, M., and Hirano, T. (1996) A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J.* **15**, 3651-3658
 131. Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X.J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., and Kishimoto, T. (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* **77**, 63-71
 132. Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (2001) Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* **20**, 5991-6000
 133. Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., Makino, S., Manabe, T., Murata, M., and Ogawa, S. (2000) Significance of ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H1635-1644
 134. Mitrova, E., and Belay, G. (2002) Creutzfeldt-Jakob disease with E200K mutation in Slovakia: characterization and development. *Acta Virol.* **46**, 31-39
 135. Taratuto, A.L., Piccardo, P., Reich, E.G., Chen, S.G., Sevlever, G., Schultz, M., Luzzi, A.A., Rugiero, M., Abecasis, G., Endelman, M., Garcia, A.M., Capellari, S., Xie, Z., Lugaresi, E., Gambetti, P., Dlouhy, S.R., and Ghetti, B. (2002) Insomnia associated with thalamic involvement in E200K Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **58**, 362-367
 136. Dietz, H.C., and Pyeritz, R.E. (1995) Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Hum. Mol. Genet.* **4 Spec No**, 1799-1809
 137. Halliday, D.J., Hutchinson, S., Lonie, L., Hurst, J.A., Firth, H., Handford, P.A., and Wordsworth, P. (2002) Twelve novel FBN1 mutations in Marfan syndrome and Marfan related phenotypes test the feasibility of FBN1 mutation testing in clinical

- practice. *J. Med. Genet.* **39**, 589-593
138. Jacobs, A.M., Toudjarska, I., Racine, A., Tsipouras, P., Kilpatrick, M.W., and Shanske, A. (2002) A recurring FBN1 gene mutation in neonatal Marfan syndrome. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **156**, 1081-1085
 139. Putnam, E.A., Zhang, H., Ramirez, F., and Milewicz, D.M. (1995) Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nat. Genet.* **11**, 456-458
 140. Wang, M., Clericuzio, C.L., and Godfrey, M. (1996) Familial occurrence of typical and severe lethal congenital contractural arachnodactyly caused by missplicing of exon 34 of fibrillin-2. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 1027-1034
 141. Maslen, C., Babcock, D., Raghunath, M., and Steinmann, B. (1997) A rare branch-point mutation is associated with missplicing of fibrillin-2 in a large family with congenital contractural arachnodactyly. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 1389-1398
 142. Tassabehji, M., Metcalfe, K., Donnai, D., Hurst, J., Reardon, W., Burch, M., and Read, A.P. (1997) Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1029-1036
 143. Li, D.Y., Toland, A.E., Boak, B.B., Atkinson, D.L., Ensing, G.J., Morris, C.A., and Keating, M.T. (1997) Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1021-1028
 144. Curran, M.E., Atkinson, D.L., Ewart, A.K., Morris, C.A., Leppert, M.F., and Keating, M.T. (1993) The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell* **73**, 159-168
 145. Hooks, M.A., Wade, C.S., and Millikan, W.J., Jr. (1991) Muromonab CD-3: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use in transplantation. *Pharmacotherapy* **11**, 26-37
 146. Reichert, J., and Pavolu, A. (2004) Monoclonal antibodies market. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 383-384
 147. Pavlou, A.K., and Belsey, M.J. (2005) The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**, 389-396
 148. Hale, G. (2006) Therapeutic antibodies--delivering the promise? *Advanced drug delivery reviews* **58**, 633-639
 149. de Wildt, R.M., Mundy, C.R., Gorick, B.D., and Tomlinson, I.M. (2000) Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat. Biotechnol.* **18**, 989-994
 150. Wu, S., Ke, A., and Doudna, J.A. (2007) A fast and efficient procedure to produce scFvs specific for large macromolecular complexes. *J. Immunol. Methods* **318**, 95-101
 151. Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. (2008) Construction of a

- fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 975-984
152. Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Stempien, M.M., Bell, G.I., and Hallewell, R.A. (1989) Evolution of CuZn superoxide dismutase and the Greek key beta-barrel structural motif. *Proteins* **5**, 322-336
 153. Fujiwara, N., Miyamoto, Y., Ogasahara, K., Takahashi, M., Ikegami, T., Takamiya, R., Suzuki, K., and Taniguchi, N. (2005) Different immunoreactivity against monoclonal antibodies between wild-type and mutant copper/zinc superoxide dismutase linked to amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 5061-5070
 154. Boissinot, M., Karnas, S., Lepock, J.R., Cabelli, D.E., Tainer, J.A., Getzoff, E.D., and Hallewell, R.A. (1997) Function of the Greek key connection analysed using circular permutants of superoxide dismutase. *EMBO J.* **16**, 2171-2178
 155. Padlan, E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **31**, 169-217
 156. Novotny, J., and Haber, E. (1985) Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4592-4596
 157. Olsen, K.E., Sletten, K., and Westermarck, P. (1998) Extended analysis of AL-amyloid protein from abdominal wall subcutaneous fat biopsy: kappa IV immunoglobulin light chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 713-716
 158. Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A., and Hamers, R. (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* **7**, 1129-1135
 159. Thomas, D.J., and Lublin, D.M. (1993) Identification of 5'-flanking regions affecting the expression of the human decay accelerating factor gene and their role in tissue-specific expression. *J. Immunol.* **150**, 151-160
 160. Tsai, B.S., and Peach, M.J. (1977) Angiotensin homologs and analogs as inhibitors of rabbit pulmonary angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **252**, 4674-4681

10. 謝辞

研究のチャンスを提供してくださって、留学生として奨学金の申請など、および研究にあたり、東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻の長棟輝行教授には、大変熱心なご指導、ご助言をしていただきまして、心から深謝いたします。また、河原正浩先生には、実験操作を基礎より熱心に指導してくださって、本論文執筆にあたり、大変熱心なご指導をくださいまして、心よりお礼を申し上げます。更に本論文をまとめるにあたり、貴重なご意見ご指導をくださった菅裕明先生、後藤由季子先生、上田宏先生に心から感謝いたします。

研究に不可欠な材料として、human EpoR 遺伝子を提供してくださった東京大学津本浩平先生、human gp130 発現ベクターを提供してくださった理化学研究所日比正彦博士、レトロウィルスベクター (pMX, pMX-GFP) と Plat-E 細胞を提供してくださった東京大学医科学研究所 北村俊雄教授、共同研究先として抗 hSOD1 抗体をご提供してくださいました兵庫医科大学藤原範子先生に心から感謝いたします。

研究室のスタッフの新海政重博士、築地真也博士、山口哲志助教、萱野英子技官（現：農業・食品産業技術総合研究機構）にさまざまな面でお世話になりました。本当にありがとうございました。同じ研究グループのメンバーの十河孝浩博士、田中健人君、陳建宏さん、林隼君にいろいろ研究に関するアドバイスをいただきました。ありがとうございました。

Honors Scholarship for Privately Financed International Students Scholarship (2005-2006), The UEHARA Memorial Foundation Scholarship (2006-2008), EPSON International Scholarship Foundation Scholarship (2008-2009) から奨学金をくださいまして、また、The 21st Century Center Of Excellence Program Research Assistant (2006-2008), The University of Tokyo Global Center Of Excellence Research Assistant (2008-2009)の支援をいただきまして、心から感謝いたします。

私の留學生活で大変お世話になりました皆様方に心から感謝いたします。