

博士論文

Signalobody を用いた
人工抗原による細胞分化誘導法の開発

中林 秀人

1. 緒言

症状の性質などから原因を推定し、診察によって位置を同定、原因の除去を行いつつ自然回復を待つといった方法が、一般的な医療では行われている。そのため、不可逆的な組織破壊に対する有効な手段は臓器移植のみであった。一方、再生医療は、機能障害に陥った生体組織に対して、細胞を積極的に利用することにより機能再生をはかるという戦略が用いられており、従来の治療では治癒が困難であった疾患に対して大きな効果が得られるのではないかと期待されている。胚性幹細胞や人工多能性幹細胞は体を形作るすべての組織の細胞への分化能と無限の自己複製能を併せ持つため、再生医療における細胞の供給源として期待されている。しかし、実際に医療に応用するためには安全性、品質、コストなどの解決すべき問題点が数多く残されている。

一般に、細胞培養・分化誘導には、増殖・分化因子などを供給するために、動物の血清やフィーダー細胞が用いられている。しかし、再生医療に用いる細胞には、安全性の観点から異種動物由来の成分を用いることはできない。そのため、血清やフィーダー細胞を使用しない細胞培養・分化法の開発が求められてきており、盛んに研究が行われている。それらの方法では、サイトカインと呼ばれるタンパク質リガンドが細胞増殖・分化誘導因子として良く用いられている。再生医療には、膨大な数の細胞が要求されるため、細胞培養・分化誘導には非常に多くのコストがかかると考えられている。中でもサイトカインは非常に高価であり、コストの増大の一因となっている。そのため、サイトカインを用いない分化誘導法の開発は再生医療の実現において、非常に大きな意義を持つと考えられる。

我々の研究室では、サイトカイン受容体の細胞外ドメインを一本鎖抗体(scFv)に置き換え、その抗体が認識する、サイトカインとは全く異なる抗原に反応してシグナルを伝達する人工受容体、**Signalobody** を作製し、細胞増殖[1]・細胞遊走[2]・細胞死 [3]の制御などに成功している(Fig. 1)。しかし、**Signalobody** を細胞分化に適用したことはなかった。**Signalobody**

はサイトカインではなく、抗体が認識する抗原に反応するため、サイトカインより安価な人工抗原を用いて細胞の分化誘導制御を行うことが可能であると考えられる。そこで、本研究では、**Signalobody** を用いた細胞分化誘導制御が可能であることをいくつかのモデルにおいて示すことで、**Signalobody** が再生医療における分化誘導コストの削減への貢献可能性を示した。

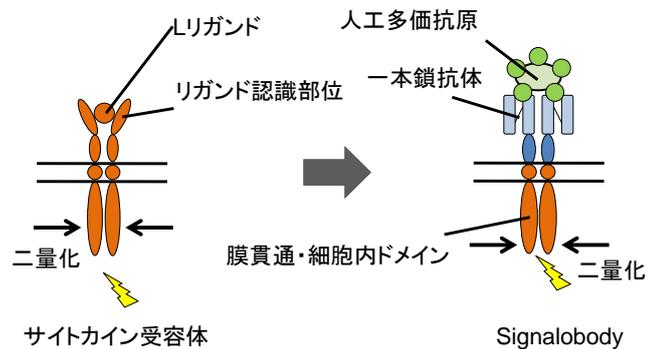


Fig. 1 **Signalobody** の概念図

2. IR Signalobody による増殖・分化誘導

インスリン受容体(IR)は生体内において様々な種類の細胞に発現しており、インスリンに応答し、細胞増殖や代謝、分化、形態変化などに関わるシグナルを細胞内に伝達する。本研究室では、Signalobody を用いて細胞増殖・細胞死・細胞遊走の制御などに成功している。そこで本章では、IR を Signalobody 化することにより IR の機能を模倣し、Signalobody によるシグナル伝達を細胞分化に拡張することを目指し、S-IR キメラを作製した。

2. 1. IR Signalobody の構築と改良

まず、細胞外ドメインとして、抗フルオレセイン一本鎖抗体とエリスロポエチン受容体(erythropoietin receptor; EpoR)D2 ドメインを、膜貫通(transmembrane; TM)ドメインと細胞内ドメインとして、IR を持つ、S-IR の作製を行った。そして、インターロイキン(IL)-3 依存性細胞株 Ba/F3 や線維芽細胞株 NIH/3T3 において、S-IR の機能を確かめた。その結果、S-IR は増殖シグナルを伝達可能であることが確かめられた。しかし、リガンド非存在下においてもシグナル伝達が起きるなど、抗原依存的なシグナル伝達は達成できなかった。そこで本項では、このリガンド非依存性の解消を試みた。

野生型 IR は、細胞外ドメインを構成する α サブユニットと主に TM ドメインと細胞内ドメインを構成する β サブユニットからなる受容体である。 β サブユニットは α サブユニットが存在しないと、自発的に 2 量化し活性化することが報告されている。今回作製した S-IR は α サブユニットを持たないため、 α サブユニットによる switch-off 制御が働かなかったことにより、リガンド非依存的なシグナル伝達を示したと考えられる。 β サブユニットにおける自発的な 2 量化には、TM ドメインが特に重要であると考えられている[4]。そこで、これまでの Signalobody における知見から、S-IR の TM ドメインを EpoR 由来のものに変更した(S-A0-IR)。さらに、細胞内ドメインの配向性を調節するために、Ala 残基を 1 - 4 個挿入することにより TM の α ヘリックス構造を延長し[5]、細胞内ドメインの配向性を改変した受容体を構築した(S-A1/A2/A3/A4-IR)。これらのキメラ受容体を Ba/F3 細胞に発現させ、IL-3 非存在、抗原存在下で培養し、増殖アッセイを行った。その結果、TM を改変したことにより、抗原依存的な増殖が見られ、さらに Ala 残基の挿入による細胞内ドメインの配向性変化により、増殖特性が変化する現象が見られた。また、IR の主要なシグナル経路である PI3K/Akt 経路と Ras/MAPK 経路のシグナル伝達分子のリン酸化についてもウエスタンブロッティングにより確認された。これらの結果から、抗原依存的な Signalobody コンストラクトの作製に成功した。

2. 2 IR Signalobody の 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化への適用

マウス線維芽細胞株 3T3-L1 は、dexamethasone (Dex)、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、インスリンの 3 つの刺激によって、脂肪細胞に分化することが知られている。そこで、我々はこの脂肪細胞分化を指標にして、IR Signalobody の分化誘導能を評価することにした。

まず、抗原非依存的ではあるが、増殖シグナルを伝達可能であることが分かっている **S-IR** を導入し、抗原非依存的に分化誘導可能であるか確かめることとした。細胞を播種し、100% コンフルエントになるまで培養を行った。そのまま、2日間培養を行い、**Dex** と **IBMX** に加え、インスリンもしくは、抗原である **BSA-FL** を用いて2日間分化誘導を促した。その後、8日間 インスリンもしくは **BSA-FL** を用いて脂肪細胞の成熟を促した。**Oil Red O** 染色により、分化した脂肪細胞の持つ脂肪を染色した。その結果、**3T3-L1** では **Oil Red O** 染色によって、インスリン刺激したウェルがインスリン刺激を行わなかったウェルより赤く染色された。このことから、インスリンの刺激により脂肪細胞への分化が促進され、脂肪が蓄積したことが示唆された。一方、**3T3-L1/S-IR** ではどの条件においても **Oil Red O** により赤く染色されたことから、**S-IR** のシグナルにより脂肪成分の蓄積を引き起こすことが示唆された。これらの結果から、抗原非依存的ではあるものの、**S-IR** は分化シグナルを伝達可能であることが示唆された。

続いて、抗原依存的に活性化する **S-IR Signalobody** の中でも、最も活性の弱い **S-A3-IR** と、最も活性の強い **S-A4-IR** を選び、**3T3-L1** 細胞に発現させ、これらのシグナルがインスリンの刺激を代用して脂肪分化を誘導できるかどうか検討した。**S-IR** の時と同様の条件で分化誘導を行った結果、**3T3-L1/S-A3-IR** では、どの条件でも **3T3-L1** にインスリン刺激を加えたものよりも低い染色度合いであった。一方、**3T3-L1/S-A4-IR** ではどの条件でも **3T3-L1** にインスリン刺激を加えたものと同程度の脂肪が蓄積されたことが示唆された。

顕微鏡での観察から、**3T3-L1** 細胞においては、インスリンによる刺激で大きな脂肪滴をもつ細胞の増加が確認されたが、**3T3-L1/S-IR** においてはどの条件においても、大きな脂肪滴の形成が見られなかった。**3T3-L1/S-A3-IR**、**3T3-L1/S-A4-IR** 細胞では、**BSA-FL** を加えることで、適切な脂肪滴の形成が阻害されている様子が観察された。これらの結果から、**IR** を元にした **Signalobody** は脂肪の蓄積を促進可能であることが示唆されたが、適切な脂肪滴の形成には至らず、むしろ阻害する働きを持つことが示された。よって、**IR Signalobody** はインスリンによる脂肪細胞分化を完全には模倣することが出来なかった。

3. **RANK Signalobody** による破骨細胞分化誘導

NFκB 活性化受容体(receptor activator of nuclear factor-kappa B, **RANK**)は、腫瘍壊死因子受容体ファミリーの一つであり、生体内において、様々な組織に発現していることが知られており、**RANK** ノックアウトマウスによる研究により、**RANK** は破骨細胞分化、リンパ節の形成、乳腺の発達において重要な働きをもつことが証明されている。中でも、破骨細胞は骨吸収を司る細胞であり、骨芽細胞による骨形成と協同して、生体内における骨代謝において重要な働きを果たしている。骨代謝のバランスの崩れは、大理石骨病や骨粗しょう症など、様々な骨に関わる疾患を引き起こすことが知られている。そこで、本章では、**RANK** を **Signalobody** 化した **S-RANK** を作製し、**S-RANK** によって破骨細胞分化を制御可能である

ことを示し、Signalobody が分化に応用可能であると実証することを目的とした。

3. 1 S-RANK によるマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞の破骨細胞分化誘導

生体内での特徴をある程度残したまま不死化した細胞株は、その扱いやすさから様々な実験において用いられる。ある一つのサイトカインにより分化する細胞株は、Signalobody を分化に応用可能であることを示すモデルとして適切であると考え、我々はそのような細胞株の一つである、マクロファージ様細胞株 RAW264 に着目した。RAW264 は RANK を発現しており、RANK リガンド(RANKL)の刺激により破骨細胞へと分化することが知られており、破骨細胞分化のメカニズムや RANK の機能解析によく用いられる細胞株である。RANK を Signalobody 化し、天然のリガンドではなく、人工抗原によって RAW264 の破骨細胞分化を達成することで、Signalobody が細胞の分化制御に応用できることを示そうとした。

細胞外ドメインに HA タグと抗フルオレセイン(FL) scFv、EpoR D2 ドメインを、膜貫通ドメインと細胞内ドメインに RANK を持つキメラ受容体、S-RANK を構築した。レンチウイルスを用いて RAW264 細胞に遺伝子導入し、抗生物質選択を行った。得られた細胞において、ウエスタンブロッティングとフローサイトメトリーを行ったところ、S-RANK の発現と表面発現が確認された。このことから S-RANK 安定発現株 RAW/S-RANK の樹立が確認された。次に S-RANK キメラ受容体が、人工多価抗原(BSA-FL)に応答し、破骨細胞分化を誘導できるかを調べた。RAW264 細胞と RAW/S-RANK 細胞を様々な抗原濃度下と RANK リガンド存在下で 5 日間培養し、分化誘導させ、破骨細胞マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)の染色を行った。その結果、RAW264 細胞では RANK リガンドを加えた時のみ、破骨細胞である TRAP 陽性多核細胞が確認された。一方、RAW/S-RANK 細胞では、全ての条件で分化細胞が見られたが、抗原を加えた条件で分化細胞の増加が確認された。これらの結果から、S-RANK は従来、細胞を活性化させる能力のない抗原に応答し、RANK の代わりに細胞にシグナルを伝達し、分化を誘導可能であることが示された。

続いて、S-RANK が抗原によって、RANK 下流シグナル伝達分子を活性化できるか確かめた。RANK は RANKL によって 3 量化されると、腫瘍壊死因子受容体関連因子(tumor necrosis factor receptor-associated factor; TRAF)ファミリーをリクルートし、NF κ B や JNK、p38 といったシグナルを活性化することが知られている。そこで、これらの分子が、実際に BSA-FL によって活性化されるのか調べてみた。

I κ B α は NF κ B に結合することによって NF κ B の活性を抑制するタンパク質であるが、RANK からのシグナルに応答してリン酸化され、分解を受けることが知られている。そこで、I κ B α のリン酸化と、分解をウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、RAW/S-RANK 細胞では I κ B α の分解とリン酸化が BSA-FL によって引き起こされることが確認された。一方、S-RANK を発現しない RAW264 細胞では BSA-FL を加えても I κ B α のリン酸化と分解は確認されなかった。このことから、NF κ B α の活性化は S-RANK によって引き起こされたことが示された。同様に、RANK によって活性化されることが知られている p38

や JNK、MEK といった MAPK 分子のリン酸化についても、ウェスタンブロッティングで検出を行った。その結果、確かに、それらの分子が S-RANK を介して、BSA-FL に応答して活性化されることが示唆された。これらの結果から、S-RANK は RANK と同等のシグナル伝達能を持つことが示唆された。以上により、S-RANK は、本来細胞を活性化させる能力のない抗原に応答し、野生型 RANK と同様に細胞にシグナルを伝達し、破骨細胞分化を誘導可能であることが示された。

3. 2 S-RANK によるマウス骨髄由来マクロファージの破骨細胞分化誘導

株化細胞は、無限の増殖能を持ち、ある程度の均一性を持つため、非常に扱いやすい細胞である。そのため、細胞内におけるシグナル伝達のメカニズムの解明などによく用いられてきた。しかし、株化された時点で、その細胞は変質してしまっており、必ずしも生体内における細胞の挙動と一致するわけではない。そこで、より生体内に近い細胞として、初代細胞が用いられる。

骨髄には造血系幹細胞を含む様々な幹細胞や血球系前駆細胞が含まれており、造血系細胞の初代細胞としてよく研究に用いられている。破骨細胞は骨髄由来の単球マクロファージ系前駆細胞をマクロファージコロニー刺激因子と RANKL で刺激することで分化誘導可能であることが知られている。前項において、S-RANK は細胞株 RAW264 を破骨細胞に分化誘導可能であることが示された。そこで本項では、マウス骨髄球由来のマクロファージにおいて Signalobody S-RANK が機能を果たすかどうかの検証を行い、より生体に近い、つまり治療に近い細胞においても Signalobody が分化誘導可能か検証を行いたいと考えている。現在、分化プロトコルと S-RANK の発現方法の検証中である。

4. 結言

本研究室では、これまでに Signalobody を用いて細胞増殖・細胞死・細胞遊走の制御に成功している。本研究では、Signalobody を用いた細胞分化誘導を試み、S-IR と S-RANK と名付けた 2 つの Signalobody を作製した。S-IR は抗原非依存的な増殖シグナルの伝達を示したため、改変を行い、抗原依存的なシグナル伝達を行う Signalobody を 5 つ構築した。このうち、S-IR, S-A3-IR, S-A4-IR を用いて 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化の制御を試みたところ、Signalobody 依存的な脂肪の蓄積が示唆されたが、大きな脂肪滴を形成する完全な分化細胞は確認されず、野生型受容体の完全な模倣には至らなかった。一方、S-RANK は、バックグラウンドにおけるシグナルの漏れが存在するものの、抗原に応答してマクロファージ様細胞株 RAW264 を破骨細胞に分化させることに成功した。現在、より治療への応用に近い細胞である骨髄前駆細胞からの破骨細胞分化への応用を目指している。これらの結果より、Signalobody による分化誘導制御の可能性が示されたことから、安価な抗原を用いた低コスト分化法の開発への応用につながるのではないかと期待される。

5. 参考論文

1. Kaneko E, Kawahara M, Ueda H, Nagamune T. Growth control of genetically modified cells using an antibody/c-Kit chimera. *J Biosci Bioeng.* 2012;113:641-646.
2. Kawahara M, Hitomi A, Nagamune T. Antigen-responsive regulation of Cell motility and migration via the signalobodies based on c-Fms and c-Mpl. *Biotechnol Prog.* 2014;30:411-417.
3. Tone Y, Kawahara M, Kawaguchi D, Ueda H, Nagamune T. Death signalobody: inducing conditional cell death in response to a specific antigen. *Hum Gene Ther Methods.* 2013;24:141-150.
4. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:85-96
5. Constantinescu SN, Huang LJ, Nam H, Lodish HF. The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Mol. Cell.* 2001;7:377-385

6. 投稿論文

H. Nakabayashi, M. Kawahara, K. Tanaka, T. Nagamune, Construction of antibody/insulin receptor chimera for growth induction of mammalian cells, *Cytotechnology*, **65**, 945-953 (2013)

H. Nakabayashi, S. Aoyama, M. Kawahara, T. Nagamune, Differentiation signalobody: demonstration of antigen-dependent osteoclast differentiation from a progenitor cell line, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Submitted