

論文の内容の要旨

論文題目 Signalobodyを用いた人工抗原による細胞分化誘導法の開発

氏名 中林 秀人

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。

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応答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・細胞死・細胞遊走の制御などに成功している。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応答するため、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。

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、**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。

まず、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細胞外ドメイン **D2** を細胞外ドメインとして、膜貫通・細胞内ドメインとして **IR** の β サブユニットを持つ受容体 **S-IR** を作製した。続いて、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、このリガンド非依存性の解消を試みた。

これまでの **Signalobody** における知見から、**S-IR** の **TM** ドメインをエリスロポエチン受容体由来のものに変更した。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、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。これらの結果から、抗原依存的な **Signalobody** コンストラクトの作成に成功した。

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。既往の報告通りに分化誘導を行った。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、**S-IR** 発現 **3T3-L1** 細胞 (**3T3-L1/S-IR**) ではインスリンの代わりに **BSA-FL** を用いた分化誘導も行った。その結果、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。

NF κ B 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、破骨細胞分化において重要な働きをもつことが証明されている。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。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。

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。RAW264 細胞に遺伝子導入し、S-RANK 安定発現株 RAW/S-RANK を樹立した。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。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、破骨細胞分化を誘導可能であることが示された。

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たが、細胞分化に応用したことはなかった。そこで、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。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。