

## 審査の結果の要旨

氏名 中林 秀人

胚性幹細胞 (ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)、体性幹細胞、組織幹細胞など、自己複製能を持つ様々な幹細胞を増幅し、さらに分化誘導して得られる組織細胞を用いて治療を行う細胞療法や再生医療、このような組織細胞を用いた創薬スクリーニングなどが近年注目を集め、その実用化に向けて効率的、経済的な分化誘導技術の開発が求められている。

本論文は、一本鎖抗体と受容体を融合したキメラ受容体 (Signalobody) を用いた人工抗原による細胞分化誘導技術の開発を目的とした研究であり、全 5 章から構成されている。

第 1 章は緒言であり、細胞療法や再生医療についての概観およびこれらの医療にまつわるコスト問題について述べた上で、サイトカインを用いない低コスト分化誘導技術の必要性と、Signalobody を用いた安価な人工抗原による低コスト分化誘導技術の開発の意義について述べている。

第 2 章では、インスリン受容体を用いた Signalobody の作製と細胞増殖活性による機能評価について述べている。まず、抗フルオレセイン (FL) 一本鎖抗体、エリスロポエチン受容体細胞外 D2 ドメイン、およびインスリン受容体  $\beta$  サブユニットの膜貫通・細胞内ドメインを連結したキメラ受容体 S-IR を分子デザインし、発現ベクターを構築した。続いて、インターロイキン-3 依存性細胞株 Ba/F3 と線維芽細胞株 NIH/3T3 において、S-IR の機能解析を行った結果、S-IR は増殖シグナルを伝達可能であることを観測した。しかしながら、特異的な人工抗原である FL 標識 BSA (BSA-FL) 非存在下においてもシグナルの伝達が観測された。このリガンド非依存性シグナル伝達を解消するために、S-IR の膜貫通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、さらに、細胞内ドメインの配向性を調節するために、細胞膜近傍部位に Ala 残基を 1-4 個挿入して膜貫通ドメインの  $\alpha$  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一連の受容体を構築した。これらのキメラ受容体を Ba/F3 細胞に発現させて機能解析を行った結果、膜貫通ドメイン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 残基の挿入により増殖特性が変化、抗原非存在下での増殖が完全に抑制され、抗原存在下でのみ増殖を誘導する改変体を見出すに至った。これらの結果から、抗原依存的な S-IR Signalobody の作製に成功したと述べている。

第3章では、**S-IR Signalobody**の脂肪細胞分化への適用について述べている。マウス線維芽細胞株 **3T3-L1** は、インスリン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、第2章で構築した改変体を含むすべての **S-IR Signalobody** をマウス線維芽細胞株 **3T3-L1** に導入して安定発現株を樹立し、インスリンによる脂肪細胞分化誘導を特異的抗原によって代用できるかを検証した。脂肪滴を染色する **Oil Red O** 染色によって脂肪細胞分化能を評価した結果、**Signalobody** の配向性の違いによって脂肪細胞分化が促進または抑制されることが明らかとなった。一方、脂肪細胞分化が促進された **Signalobody** においては、抗原非存在時にも脂肪細胞分化が見られた。これらの結果から、**S-IR Signalobody** はインスリン受容体による脂肪細胞分化シグナルを模倣できるが、抗原非存在時のシグナルの漏れに関しては改善の余地があると述べている。

第4章では、**NF $\kappa$ B** 活性化受容体(**receptor activator of nuclear factor-kappa B, RANK**)を用いた **Signalobody** によるマクロファージ様細胞株 **RAW264** の破骨細胞分化誘導について述べている。**RAW264** 細胞は **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いる。そこで、本論文では **RANK** を **Signalobody** 化し、天然のリガンドである **RANKL** の代わりに人工抗原によって **RAW264** の破骨細胞分化を達成できるかどうかを検証した。まず、抗 **FL** 一本鎖抗体、エリスロポエチン受容体細胞外 **D2** ドメイン、および **RANK** の膜貫通・細胞内ドメインを連結したキメラ受容体 **S-RANK** を分子デザインし、発現ベクターを構築した。これを **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、特異的抗原 **BSA-FL** に応答し、破骨細胞分化を誘導できるかについて、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**)の染色により検証した。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、抗原非存在時にも若干の分化細胞が認められたものの、抗原を加えた条件で分化細胞数の明らかな増加が確認された。また、シグナル伝達解析の結果、**S-RANK** は天然型 **RANK** とほぼ同等のシグナル伝達活性を有していることが示された。これらの結果から、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な **S-RANK Signalobody** の作製に成功したと述べている。

以上、本論文では、**Signalobody** による分化誘導制御に世界で初めて成功し、再生医療の発展におけるボトルネックともいえる分化細胞調製のコスト問題に対する解決法を提案している。この成果は化学生命工学、特に細胞工学、再生医療分野の発展に寄与するところ大である。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。