

論文の内容の要旨

論文題目 Cell growth control with an antibody/receptor chimera
 (抗体／受容体キメラを用いた細胞増殖制御)

氏 名 河原 正浩

1. 緒言

動物細胞培養によって抗体、サイトカインなどの有用タンパク質の生産が工業的に広く行われている。動物細胞の増殖には各種のサイトカインが必要であり、その供給源として牛胎児血清が用いられてきたが、目的タンパク質の高純度分離精製が困難であること、プリオン混入といった安全面での危惧があることから、無血清培地への転換が求められている。しかし、無血清培地を用いる場合には細胞増殖を活性化するために高価な増殖因子の添加が必要となる場合が多く、培地コストの観点から工業的規模の動物細胞培養の大きな問題点になっている。

また、近年、新しい治療法として遺伝子治療が期待されているが、標的細胞への遺伝子導入効率は充分でない場合が多い。これを克服するための方法として、遺伝子導入細胞だけを生体内または外で選択的に増幅する、という手法が考えられる。選択的増幅の実現の方法としては導入したい遺伝子と同時に増殖シグナルを伝達するサイトカインレセプターの遺伝子を導入することが考えられるが、サイトカインを投与すると生体内にある通常の細胞に何らかの副作用を引き起こしてしまうという問題点が存在する。

これらの課題を克服する方法として、サイトカインとは異なる安価なりガンドに応答して、細胞内へサイトカインと同様なシグナルを伝達できるような人工受容体を創製する方法が考えられる。本研究では、無数の組み合わせと高い特異性を持つ抗原-抗体系に着目し、

サイトカイン受容体のリガンド結合ドメインを抗体の抗原結合部位で置換した抗体/受容体キメラを作製し、任意の抗原を添加することによりサイトカインのシグナル伝達を代用することを目指した。サイトカイン受容体はサイトカイン添加によって引き起こされる二量体形成によって活性化されるため、用いる抗原-抗体系は、抗原がない状態では互いにアフィニティを持たず、抗原添加時のみ近接して強いアフィニティを持つ必要がある。本研究ではこのような性質を持つ抗原-抗体系のモデルとして、安価な抗原であるニワトリ卵白リゾチーム(HEL)とそれに対する抗体HyHEL-10の可変領域V_H、V_Lを用いた。

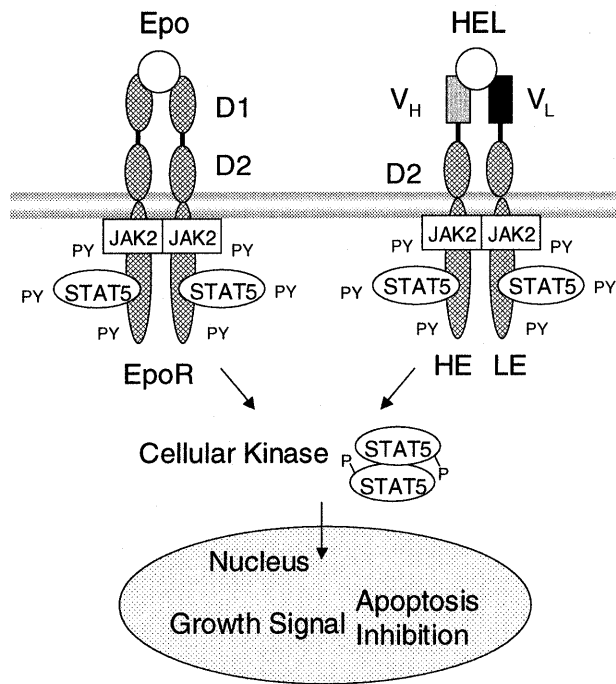


Fig. 1. Signal transduction of wild-type EpoR and an antibody/EpoR chimera.

2. 抗体/EpoR キメラの創製と血球細胞の増殖制御

サイトカイン受容体のひとつであるエリスロポエチン受容体(EpoR)は 2 つの細胞外ドメイン D1、D2 を持ち、N 末端側の D1 ドメインに Epo が結合する。そこで、EpoR の D1 ドメインを V_H または V_L で置換した 2 種類のキメラ受容体遺伝子 V_H-EpoR(HE)、V_L-EpoR(LE)を作製し(Fig. 1)、IL-3 依存性 pro-B 細胞株 Ba/F3 に導入した。遺伝子導入クローンの増殖アッセイの結果、HEL 濃度依存的な増殖促進効果が見られた。しかし、HEL を添加しない場合にもある程度の増殖が見られ、増殖シグナルの ON/OFF を厳密に制御することは出来なかった。

この原因として、抗体と EpoR を直接連結したことによる立体障害やひずみにより、キメラ受容体のダイマーやオリゴマーが常に生成し、シグナル伝達が HEL 非依存的に生じてしまっている可能性があると考えた。そこで、V_H または V_L と EpoR の間にリンカー配列 Gly-Ser-Gly (GSG)を挿入したキメラ受容体を作製し、IL-3 依存性骨髓系細胞株 32D に導入した。その結果、リンカーなしのキメラ受容体発現細胞は IL-3 非存在下で HEL 添加の有無にかかわらず増殖が見られたのに対し、GSG リンカーを挿入したキメラ受容体発現細胞は IL-3 非存在下では増殖が見られず、HEL 濃度依存的な増殖が見られた。以後の実験では、厳格な HEL 濃度依存的増殖を示した GSG リンカー挿入キメラ受容体を用いた。

3. gp130 ホモダイマーおよび EpoR-gp130 ヘテロダイマーによる増殖制御

EpoR 以外の受容体でも本研究の手法が適用可能かどうかを検証するために、抗体/EpoR キメラ(HE および LE)の細胞内ドメインを、ハイブリドーマ細胞や造血幹細胞など幅広い種類の細胞でシグナル伝達を行う IL-6 受容体のサブユニット gp130 の細胞内ドメインに置換したキメラ受容体(Hg および Lg)発現ベクターを作製した。これらを Ba/F3 細胞に導入したところ(Ba/Hg+Lg 細胞)、HEL 濃度依存的な増殖を示したことから、抗体/gp130 キメラが機能的であることが示された。

次に、これまで作製したキメラ受容体を組み合わせて、天然に存在しないと考えられる EpoR-gp130 細胞内ドメインヘテロダイマーを人為的に誘導して機能解析するために、Hg と LE を Ba/F3 細胞に同時導入した(Ba/Hg+LE 細胞)。増殖アッセイの結果、Ba/Hg+LE 細胞は HEL 非存在下では完全に死滅するのに対し、HEL 添加時には、高い生存率を保ったまま濃度依存的に増殖した。また、免疫沈降実験の結果から、Hg と LE は HEL がいない状態でもヘテロダイマーをあらかじめ形成していることが分かった。

最近、野生型の EpoR, gp130 とともに二量体誘導だけでは活性化されず、コンフォメーションが最適化される必要があることが報告された。本研究では、HEL がなくても存在する Hg-LE ダイマーはシグナル伝達をせず、HEL 添加によってのみシグナル伝達が生じた。この結果は、EpoR-gp130 ヘテロダイマーのように人為的に誘導したヘテロダイマーも活性化させることが可能であることを示し、この場合も野生型の受容体と同様に受容体のコンフォメーションが活性化に重要であることを示唆している。

4. 抗体/gp130 キメラによるハイブリドーマ細胞の増殖制御

本研究の手法が有用物質生産細胞に適用可能であることを示すために、抗体産生細胞であるハイブリドーマ細胞を標的細胞として選んだ。一般的にハイブリドーマ細胞は IL-6 によって増殖制御されることが報告されているが、この IL-6 の作用を安価な HEL で代用することを目指した。そこで、IL-6 依存性ハイブリドーマ細胞株 7TD1 に抗体/gp130 キメラ(Hg および Lg)を同時導入し(7TD/Hg+Lg 細胞)、ハイブリドーマ用基礎培地である eRDF に 0.6% 血清を添加した培地に低血清馴化し、HEL 依存的に増殖するかどうかを調べた。その結果、HEL 濃度が 10 µg/ml 以下では HEL 濃度依存的に増殖が促進された。また、このクローンの IL-6 依存性増殖を同様に調べたところ、IL-6 濃度が 1 ng/ml 以下では IL-6 濃度依存的に増殖が促進され、HEL 添加による増殖応答との相関が見られた。また、完全無血清培地 ASF104 にも馴化した結果、HEL 濃度依存的な増殖が見られ、ELISA を行った結果、抗体生産も誘導されていることが分かった。以上のことから、抗体/gp130 キメラの導入によってハイブリドーマ細胞の増殖を安価な HEL で制御できることが示された。

5. 遺伝子導入細胞の選択的増幅法

目的遺伝子導入細胞を抗体/受容体キメラによって選択的に増幅できることを示すために、目的遺伝子のモデルとして緑色蛍光タンパク質 EGFP を選び、LE の下流に内部リボソーム

結合部位(IRES)配列を介して連結した(LEIGFP)。HE と LEIGFP を IL-3 依存性 32D 細胞に同時導入し、抗生物質耐性細胞を得た。フローサイトメーターによる解析の結果、抗生物質選択後の遺伝子導入細胞には、さまざまな EGFP 発現量を持つ細胞が混在していた。続いて、IL-3 を除去し HEL を添加した培地で選択した。得られた HEL 選択後の細胞をフローサイトメーターで解析した結果、EGFP 発現量の最も多い細胞群のみが存在した。増殖アッセイの結果、HEL 選択後の細胞は HEL 濃度依存的に増殖したことから、EGFP 高発現細胞の選択的増殖効果は HEL の添加によって誘導されたことが示された。Western blotting の結果、HEL 選択前と比較して HEL 選択後には LE の発現量が増えていたが、これは LE 発現量の多い細胞の方が HEL への応答性が高いためと考えられる。IRES の前後に配置された遺伝子の発現量には相関があることから、VL-EpoR 発現量が高い細胞は EGFP 発現量も高くなるため、HEL 選択によって EGFP 高発現細胞が増幅されたことが示唆される。

6. 結言

本研究では、まず抗体/EpoR キメラおよび抗体/gp130 キメラの分子構築を行って IL-3 依存性血球細胞株に導入し、HEL 濃度依存的な増殖活性を指標として機能性確認を行った。その結果、EpoR ホモダイマー、gp130 ホモダイマー、および天然には存在しないと考えられる EpoR-gp130 ヘテロダイマーも HEL 濃度依存的に増殖シグナルを伝達しうることを見出し、抗体/受容体キメラを用いて抗原依存的な細胞増殖制御を行うことに初めて成功した。続いて、IL-6 依存性ハイブリドーマ株に抗体/gp130 キメラを導入して、IL-6 の増殖促進効果を HEL で代用可能であることを示し、有用物質生産細胞を安価に増殖制御する方法論を提案した。さらに、モデル遺伝子 EGFP と同時に抗体/EpoR キメラを血球細胞株に導入し HEL で選択した結果、EGFP 高発現細胞を選択的に増幅できることを示し、遺伝子治療効果を向上させるための目的遺伝子導入細胞の選択的増幅法としての応用可能性を示した。