

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 河原 正浩

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。しかし、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。従って、遺伝子導入細胞だけを生体内または外で副作用なく選択的に増幅する新しい手法の開発が望まれている。

本論文ではこれらの課題を克服する方法として、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、増殖シグナル伝達に関わる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ている。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、抗原添加時にのみ近接して強いアフィニティを持つ必要がある。本論文ではモデル系として安価な抗原であるニワトリ卵白リゾチーム(HEL)とこのような性質を持つ抗体 HyHEL-10 の可変領域 VH、VL を用いて実験を行っている。前半部分では各種の抗体/受容体キメラの作製と血球系培養細胞を用いた抗体/受容体キメラの機能解析を行っており、後半部分では物質生産細胞の安価な増殖制御および遺伝子導入細胞の選択的増幅法への応用について述べている。

第1編は序論として研究目的と論文構成、第2編では研究の背景、既往の研究について述べている。

第3編は、抗体/受容体キメラの機能解析編としてまとめられており、3つの章から構成されている。

第3-1章では、エリスロポエチン受容体(EpoR)の細胞外ドメインの一部を HyHEL-10 の VH または VL で置換したキメラ受容体(抗体/EpoR キメラ)の分子構築と機能解析について述べている。まずは Epo 結合ドメインである D1 ドメインを単純に除去し、代わりに VH、VL で置換したキメラ受容体を IL-3 依存性 Ba/F3 細胞で発現させた結果、抗原である HEL 濃度依存的な増殖制御を行うことに成功している。このとき、HEL 非存在下でも増殖が生じたが、この原因を抗体と EpoR を直接連結したことによる立体障害やひずみによるものと考え、その連結部位のリンカーとして Gly、もしくは Gly-Ser-Gly を挿入したキメラ受容体を作製し改良を試みている。その結果、Gly-Ser-Gly リンカーを挿入することでシグナルの ON/OFF を厳密に制御することに成功している。また、各キメラ受容体の比較から、リガンド-レセプター複合体のコンフォメーションの微妙な相違がシグナル伝達に影響を及ぼす可能性について考察している。

第3-2章では、他の受容体シグナル伝達系にも本論文の手法が適用できることを示すために、

抗体/EpoR キメラの細胞内ドメインを c-Kit、gp130 に置換したキメラ受容体の機能解析を行っている。抗体/c-Kit キメラについては、細胞膜上でリガンド-レセプター複合体が検出されたが、HEL 依存的なシグナル伝達は生じず、機能的ではないことが示されている。それに対し、抗体/gp130 キメラについては HEL 濃度依存的な増殖シグナル伝達を確認され、機能的であることが示されている。

第3-3章では、前2章で作製したキメラ受容体を組み合わせて EpoR-c-Kit、c-Kit-gp130、EpoR-gp130 の細胞内ドメインヘテロダイマーを人為的に誘導し、機能解析を試みている。その結果、EpoR-c-Kit、c-Kit-gp130 という天然のサイトカインの協同作用の模倣は達成されなかったが、非天然と考えられる EpoR-gp130 のヘテロダイマーが効率の良い増殖シグナルを伝達することを見い出している。また、免疫沈降実験の結果、HEL 非存在下でもキメラ受容体がヘテロダイマーを形成していることを示し、HEL 依存的な抗体/EpoR-gp130 受容体キメラのコンフォメーション変化がシグナル伝達の活性化に重要であると考察している。

第4編は抗体/受容体キメラの応用編としてまとめられており、2つの章から構成されている。

第4-1章では、IL-6 依存性ハイブリドーマ細胞株 7TD1 に抗体/gp130 キメラを導入している。HEL を添加することにより、低血清および無血清培地において IL-6 を添加した場合とほぼ同等の増殖および抗体生産が誘導されることを示し、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ている。

第4-2章では、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する方法論について述べている。まず、抗体/EpoR キメラを目的遺伝子のモデル EGFP と同時に導入し、抗生物質選択、HEL 選択を行い、EGFP 発現量を比較している。抗生物質選択ではさまざまな EGFP 発現量を持つ細胞が混在するのに対し、引き続き HEL 選択することによって EGFP 高発現細胞を選択的に増幅できることが示されている。また、第3編の機能解析の結果機能的であったキメラ受容体のペアを用いて、抗生物質選択を介さず、抗原選択を直接行うことにより、EGFP 陽性細胞を選択的に増幅することに成功している。

第5編は第3編、第4編での結果を踏まえて、全体を統括する考察が述べられており、新たな抗原特異性を持つ抗体/受容体キメラを得るための戦略や、今後の研究の展開および応用可能性について言及している。

第6編は本論文の結言である。

以上、本論文は種々の抗体/受容体キメラを作製して機能解析を行うとともに、これらを用いた有用物質生産細胞の安価な増殖制御法と遺伝子導入細胞の選択的増幅法を示したものである。これらの成果は化学生命工学、特に細胞工学、遺伝子治療分野の進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。