

論文の内容の要旨

論文題目 キメラ受容体を用いた新規抗体ライブラリー選択法の開発

氏名 劉 文海

1. 緒言

抗体はその高い抗原特異性を利用して様々な物質に対する検出系に用いられており、任意の抗原に対する高い親和性を持つ抗体断片を簡便に得る方法の開発が望まれている。抗原を特異的に認識する抗体の獲得法として、動物への抗原の免疫やファージディスプレイ法が用いられてきたが、前者は生体毒性の高い抗原を免疫できない、そのままでは単価抗原に対する抗体が得られない、時間がかかる、後者は非特異的結合クローンが取れやすく、操作が煩雑といった欠点がある。迅速且つ簡便な抗体ライブラリー選択法を開発するために、本研究で注目したのはサイトカインとサイトカイン受容体である。動物体内ではサイトカインと呼ばれる各種の蛋白質が、細胞膜表面にある受容体と結合することで細胞の増殖や分化をコントロールする役割を果たしている。当研究室では受容体のサイトカイン結合部位を抗体の抗原結合部位 (抗体可変領域 V_H , V_L) に置換したキメラ受容体を作製し、外部から加える抗原の量によって人為的に細胞の増殖を制御することに成功した。既往の研究で作製されたキメラ受容体は、erythropoietin receptor (EpoR) の細胞外ドメイン D1, D2 のうち D1 ドメインを抗 fluorescein (FL) 抗体 single-chain Fv (ScFv) で置換したが、抗原非存在下でも増殖シグナルが生じてしまった。そこで、本研究ではまずキメラ受容体の分子構築を再度行い、その中から抗原の結合によってのみ増殖活性を誘導可能なキメラ受容体の探索を行った。この研究をさらに進め、抗原の有無により細胞増殖の ON/OFF 制御ができたキメラ受容体の抗体部分をライブラリー化して細胞膜上に発現させ、任意の抗原を加えることにより、目的蛋白質と結合する Fv-受容体キメラを膜に提示している細胞だけが細胞内に増殖シグナルを伝達して増殖できるが、それ以外の細胞は死滅するような系を構築し、抗体ライブラリーの中から、高い結合能を持つ抗体を増殖活性を指標として迅速且つ簡便にスクリーニングする手法を開発する。

2. 抗体/EpoR キメラのドメイン構造及び配向性の変化によるシグナル伝達への影響

抗原の結合によってのみ増殖活性を誘導可能なキメラ受容体の探索を行うために、HA タグ/抗体/EpoR キメラ受容体のドメイン構造及び配向性の変化がシグナル伝達に及ぼす影響

を調べた。具体的には、①ScFv を EpoR の細胞外 D1D2 ドメインに融合するキメラ受容体、D1 または D2 だけを残す、または D1,D2 とともに削除するキメラ受容体を構築した；②細胞内ドメインの配向性を変化させるため、構築したキメラ受容体の膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間の α -ヘリックス形成領域に1残基当たり約 110° 回転させる効果を有するアラニン残基を1~4個導入することを試みた。構築したキメラ受容体遺伝子を IL-3 依存性マウス pro-B 細胞株 Ba/F3 に導入後、キメラ受容体の抗原である FL 融合した BSA (BSA-FL) に対する応答性を growth assay で検討し、上述の分子デザインがキメラ受容体のシグナル伝達に及ぼす影響を考察した。その結果、①、抗原 BSA-FL はキメラ受容体の構造によって inverse agonist または agonist として働いた。②、Ala 残基を導入することにより、BSA-FL に対する増殖依存性の変化があった。以上より、細胞外ドメイン及び細胞内ドメインのコンフォメーションが抗原応答性に大きく影響することが分かった。

キメラ受容体のコンフォメーション変化のシグナル伝達に対する影響を調べるために、ダイマー化を誘導する BSA-FL, Epo, 13 mer の回文配列 FL 標識オリゴ DNA をアニーリングさせて作製した FL dimer-13, mouse anti-HA 抗体と、オリゴマー化を誘導する mouse anti-HA plus anti-mouse IgG F(ab')₂ などのリガンドを使って刺激した。キメラ受容体によるシグナル伝達に強く関与している細胞内蛋白質の Janus kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) と ERK2 のリン酸化レベルを調べた。リン酸化レベルの特徴をまとめると、①、多くの受容体における JAK2, STAT5, ERK2 のリン酸化レベルは細胞内ドメインの角度が約 220° 変わるごとにピークがみられる傾向があった。②、それぞれのリガンドはそれぞれの受容体において異なる刺激効果を与えた。

3. 厳密にリガンド依存性を持つフルオレセイン応答性キメラ受容体の構築

前項の HA タグ/抗体/EpoR キメラでは、抗原非存在下での増殖バックグラウンドが存在した。そこで抗原の結合によってのみ増殖活性を誘導可能なキメラ受容体を構築するために、構築した19種類のキメラ受容体の細胞内ドメインを EpoR 細胞内ドメインから gp130 細胞内ドメインに置換して新しいキメラ受容体を構築し、Ba/F3 細胞に導入した。キメラ受容体の抗原 BSA-FL に対する応答性を growth assay で検討した。その結果、細胞外ドメインは ScFv のみ、膜貫通ドメインは EpoR 細胞膜貫通ドメイン、細胞内ドメインは gp130 細胞内ドメインの構造を持つキメラ受容体 Sg が BSA-FL に対して厳密なリガンド依存性を示した。

4. キメラ受容体を用いた抗 SOD (Superoxide dismutase) 抗体ライブラリーの選択

本研究では抗原として家族性の筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子であるヒト SOD (hSOD1) を選んだ。hSOD1 を使って免疫したマウスの脾臓細胞から PCR 法を用いて ScFv 部分ライブラリー (Anti- hSOD1 ScFv Library), V_H または V_L 部分のみのライブラリー (Anti- hSOD1 V_H Library と Anti- hSOD1 V_L Library) を増幅した(兵庫医科大学藤原範子先生との共同研究)。これらのライブラリーを Sg の ScFv 部分に組み込み、抗体キメラ受容体ライブラ

リーを構築し、Ba/F3 細胞表面で発現させ、hSOD1 に応答して増殖する細胞のクローンを回収した。取得したクローンはいずれも抗原非存在下でも増殖シグナルが生じてしまったが、SOD の添加により増殖促進効果があったことから、キメラ受容体の抗体部分は抗原 SOD に結合していることが示唆された。

これらの細胞を回収して、ゲノム PCR により hSOD1 に結合性を示した抗体部分を増幅した。これを発現プラスミドに組み込み、COS-1 細胞での一過性発現系を用いて、V_H、V_L または ScFv の形で分泌型抗体を調製した。ここで分泌型抗体の N 末端に HA-tag、C 末端に His-tag が付くように発現プラスミドを設計し、回収した培養上清の中に含まれる抗体濃度および獲得したクローンの hSOD1 に対する結合性を ELISA 法により検証した。その結果、取得したクローンのうち 6 クローンにおいて弱いながらも SOD に対する結合性が観察された。

5. 結言

本研究では、まず抗体/EpoR キメラ受容体における細胞外ドメイン構造及び細胞内ドメインの配向性がシグナル伝達に与える影響について検証した結果、両方のファクターが共に抗原応答性に大きく影響を及ぼすことが分かった。しかし、抗原結合時のみ増殖活性を持つキメラ受容体を得られなかったため、細胞内ドメインを gp130 に置換したキメラ受容体を構築して機能解析を行った結果、細胞外ドメインは ScFv のみで、EpoR 細胞膜貫通ドメインと gp130 細胞内ドメイン持つキメラ受容体 Sg が BSA-FL に対して厳密なりガンド依存性を示した。続いて、キメラ受容体 Sg の ScFv 部分を抗 SOD 抗体ライブラリーに置換したライブラリーを構築した。細胞表面に抗体ライブラリーキメラ受容体を発現させ、抗原 SOD を添加して培養し、増殖したクローンを回収して、抗体断片をゲノム PCR により増幅し COS-1 細胞を用いて抗体を発現させた。取得したクローンの SOD に対する結合性を Sandwich ELISA で評価した結果、6 クローンにおいて SOD に対する結合性が示唆された。本研究では抗体可変領域 Fv が抗原存在下で安定な複合体を作ることと、受容体が二量体を形成して増殖シグナルを伝達するという性質を利用し、目的蛋白質に対する抗体 Fv を膜表示している細胞だけを短時間にスクリーニングできる系を開発できる可能性を示した。