

論文の内容の要旨

論文題目 チロシンキナーゼ型受容体のケミカルバイオエンジニアリング

伊佐真幸

序論

チロシンキナーゼ型受容体 (receptor tyrosine kinase: RTK) は活性化することで細胞内にシグナルが伝達され、細胞増殖、細胞遊走、細胞骨格の再構成等の様々な細胞応答を調節することで血管、免疫および神経系等の様々な生理機能を制御している。RTK の機能制御を行うことは、基礎研究や臨床研究の発展に非常に有用である。そこで本研究では RTK のシグナル機能の解明及び創薬を目指し、分子生物学的な手法を用いて RTK を人工的に改変、修飾し、化学小分子を用いて RTK の機能制御を行う二つの新規ケミカルバイオエンジニアリング手法の確立を目指した。

第一章 「光依存的なチロシンキナーゼ型受容体活性化の制御」

細胞における RTK シグナルにおいてもとりわけ細胞内の μm オーダーの局所での RTK の活性化の時空間パターンは神経細胞の軸索伸長や細胞運動の方向決定等を含む様々な細胞応答の決定的な要因であると考えられている。しかしながらこれまでの手法では、RTK 活性の時空間パターンを制御することが困難であったため、局所における RTK の生理学的、生化学的な機能に関する理解は進んでいない。この問題を解決するためには、目的の RTK 分子を高い時間分解能で限局した場所で活性化する手法が必要

である。本研究では細胞内局所での RTK シグナルの活性化を実施する方法論の確立を目指した。

方法

血小板由来成長因子受容体または脳神経由来栄養因子受容体の細胞外領域を抗フルオレセイン一本鎖抗体と置き換えたキメラ受容体を作製し、NIH3T3 細胞に発現させた。キメラ受容体発現細胞に対し、多価のフルオレセインを配したタンパク質を投与し、キメラ受容体のリン酸化をウェスタンブロット法、カルシウム濃度変化をカルシウム指示薬によって評価した。多価のケイジドフルオレセインと一つの保護基の付いていないフルオレセインを配したタンパク質を作製し、ケイジド人工リガンドとして用いた。キメラ受容体発現細胞の細胞外液にケイジド人工リガンド加え、洗浄した後、直径 50 μm の範囲に光照射を行った際の、カルシウム濃度変化を評価した。

結果と考察

キメラ受容体が機能するかどうかを確かめるため、フルオレセインを多価に配した人工リガンドを用いて RTK 由来の細胞内シグナル誘導が生じるかどうかを検証した。その結果、人工リガンド依存的なキメラ受容体の自己リン酸化、細胞内カルシウム濃度上昇の各細胞内シグナル誘導を確認した。この結果から、作製したキメラ受容体は機能し、細胞内シグナル誘導が可能であることが示された。

続いてケイジド人工リガンドを用いて、光照射依存的な RTK シグナルの誘導が可能であるかどうか検討した。ここで用いるケイジド人工リガンドはキメラ受容体と一対一で結合するが、分子内に保護基の付いていないフルオレセインは一つしかないためキメラ受容体を架橋することは出来ない。ここで光照射を行うことで、受容体に結合したケイジド人工リガンド内のケイジドフルオレセインの保護基が外れ、産生されたフルオレセインによってキメラ受容体の架橋が生じると期待した。ケイジド人工リガンドをキメラ受容体に標識し、光照射を行い、カルシウム濃度上昇が誘導されるかどうかを検証した。その結果、光照射を行った範囲の細胞でのみ細胞内カルシウム濃度上昇が確認された。本研究では有機小分子を用いたケイジド人工リガンドとキメラ受容体と光照射を組み合わせることで局所的な RTK シグナル誘導法を確立した。

第二章 「HER2 内在化誘導薬の探索」

RTK である上皮成長因子受容体ファミリーの HER2 タンパク質は卵巣がん、乳がん等で過剰発現が認められ、細胞増殖の制御に深く関わっていることが知られている。

HER2 の抗体医薬であるトラスツズマブは良好な治療成績を得ているが、タンパク質であるため品質管理の難しさやコストの高さが問題となるので、小分子化合物ベースの治療薬の開発が期待されている。

細胞膜上の HER2 が分解されることで HER2 の機能は抑制される。分解する過程では、HER2 が細胞内へと取り込まれる内在化過程を有しているため、HER2 の機能抑制を誘導する化合物を探索するためには HER2 の内在化を指標とすることが有効であると考えた。HER2 が細胞膜上に存在する時は、中性環境下 (pH 7.4) にさらされ無蛍光性で、酸性細胞内小胞 (pH 4-6) に取りこまれた時に蛍光性を示す蛍光プローブを開発し、効率良く HER2 を標識することで、HER2 の内在化を感度良く検出できると考えた。本研究では HER2 の内在化を誘導する小分子化合物を探索するセルベースのスクリーニング系の確立を目指した。

方法

pH を感受し特異的な標識を実現するために、ローダミンを基にした pH 感受性蛍光色素を Halo タグリガンドと結合させた pH プローブ (RhPM Halo リガンド) を開発した。また Halo タグタンパク質融合 HER2 (Halo-HER2) を作製し、卵巣がん由来細胞 SKOV3 に発現させた。Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞の細胞外液に pH プローブ、17-AAG を投与し、細胞内のアルカリ化処理の前後の蛍光画像を蛍光顕微鏡を用いて取得した。Halo-HER2 発現 SKOV3 細胞を 384 ウェルプレートに播種し、接着させた後、pH プローブと評価対象の化合物または陽性対照の 17-AAG、陰性対照の DMSO を加え 5 時間培養後、細胞内小胞のアルカリ化処理を行った。アルカリ化前後の蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーで測定した。各プレートの Z'-factor を算出した。

結果と考察

HER2 の内在化を検出するために開発した pH 感受性色素は、中性付近ではほとんど蛍光を持たず、pH 4-6 付近で強い蛍光を持つ (pH5.0 と pH7.4 の蛍光比 : 15 倍) という特性を示した。

HER2 の内在化を検出することが可能であるかを確かめるため、Halo-HER2 発現 SKOV3 に RhPM Halo リガンドと HER2 内在化を誘導することが既に知られている 17-AAG の投与を行ったところ、17-AAG を投与した細胞特異的に粒状の蛍光シグナルが観察された。vehicle 投与時と比較したところ、17-AAG 投与で有意に大きな蛍光強度が確認された。さらに細胞内小胞のアルカリ化処理を行ったところ、粒状の蛍光シグナルは消失した。この結果から、蛍光強度変化のみを指標とし、Halo-HER2 の内在化を評価できることが示唆された。

続いて細胞内小胞の蛍光強度変化のみを指標としたスクリーニングが実施できるかを確かめるために、384 ウェルプレートと蛍光マイクロプレートリーダーを用いて 10,957 化合物のスクリーニングを実施した。ハイスループットスクリーニング系の質の評価指標である "Z'-factor" の値は 94.6% の確率で、優秀な系の基準である 0.5 を超えていたことから、非常に安定したスクリーニング系であることが示された。スクリーニングでヒットした化合物には、HER2 の内在化を誘導することが既知の化合物の他に作用未知の化合物も含まれており、新規 HER2 機能抑制薬の創薬が期待される。

結論

本研究では RTK シグナルの局所での制御法と HER2 の内在化誘導薬の探索法という二つのケミカルバイオエンジニアリング手法を確立した。今後構築した RTK の局所的な制御法を用いることで RTK の局所シグナルの役割の解明や、スクリーニングで得られたリード化合物を基にした抗癌剤の創薬が期待される。今回作製したキメラ受容体や Halo 融合 HER2 の RTK の配列を別の RTK 配列と置き換えることで様々な RTK のシグナル制御や内在化誘導薬の探索が可能であると期待される。