

# 細胞内シグナル伝達を操る： 再生医療・創薬への応用を目指して

河原 正浩

## はじめに

我々の生体内にはさまざまな種類の細胞が存在し、それぞれの細胞が外界の変化に適応しながら、きわめて高度な生体システムを維持している。これを達成するためには、個々の細胞が外界の変化のシグナルを受容し、迅速にその情報を細胞内に伝達して、適切な細胞応答を生み出す仕組みが必要である。実際、特に外界と接する細胞膜上には、外界の変化のシグナルを受け取る受容体が多種類存在し、そのシグナルの種類に応じて異なる細胞応答を引き起こす。その間を仲介する重要な役割を果たすのが細胞内シグナル伝達であり、数多くのシグナル伝達分子が相互作用し、多くは翻訳後修飾により活性調節されることで、順次下流の分子へカスケード的に情報が伝達されていく。その結果、増殖、分化、遊走、死といった細胞運命が制御されている。

このように、細胞内シグナル伝達は細胞運命制御という医療応用上きわめて重要なプロセスを司っており、これを人為的に操ることができれば、再生医療や創薬への応用が期待される。そこで筆者らはこれらの応用を指向して、細胞内シグナル伝達の起点である受容体に焦点を当て、そのリガンド認識特異性やシグナル伝達特性を改変する研究を行ってきた<sup>1,2)</sup>。本稿ではこれらのアプローチのうち、リガンド認識特異性の改変による研究成果について概説する。

## シグナル伝達抗体：Signalobody

抗体は標的抗原に対し高い特異性と親和性を有することから、受容体のリガンド認識部位を抗体に置換すれば、細胞運命を制御するという受容体の有用なシグナル伝達機能を抗原の添加によって制御できるのではないかと考えた。抗原-抗体のペアはほぼ無数に存在するため、異なる抗原-抗体-受容体の組合せを独立に制御することも原理的には可能である。また、抗原として安価な物質を選べば、高価なサイトカインを用いずに再生医療に有用な細胞を低コストで調製する技術にもなりうる。

そこで、筆者らはサイトカイン受容体のリガンド認識部位を一本鎖抗体 (scFv) に置換したキメラ受容体を

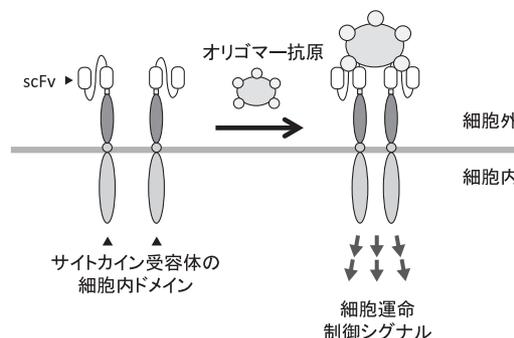


図1. Signalobody の概念図

構築した (図1)。サイトカイン受容体は二量体以上のオリゴマー化により活性化されるので、キメラ受容体はオリゴマー抗原を加えることでオリゴマー化され活性化されることが想定される。この原理を実証するために、抗体として抗フルオレセイン (FL) scFv, 抗原としてFLが複数標識されたBSA (BSA-FL), 受容体としてタイプIサイトカイン受容体4種類または受容体チロシンキナーゼ4種類を用いたキメラ受容体発現ベクターを作製し、培養細胞株および初代培養細胞にて発現させた結果、抗原依存的な受容体シグナル伝達を引き起こせることが分かった。そこで、この一連のキメラ受容体をシグナル伝達抗体 (signalobody) と命名した。

本稿ではこのうち、受容体チロシンキナーゼの一つであるマクロファージコロニー刺激因子受容体 (c-Fms) を用いた signalobody (scFv-c-Fms; S-Fms) についてまず紹介する。S-Fmsをマウス骨髄系前駆細胞株FDC-P1で発現させ (FDC/S-Fms), 機能解析を行った<sup>3)</sup>。その結果、S-Fmsは特異的抗原であるBSA-FL依存的に細胞増殖を誘導し (図2), 天然型のc-Fmsが活性化することが知られているRas/MAPK, PI3K/Akt, JAK/STATシグナル経路の分子を活性化することが示された。また、ケモタキシスチャンパーを用いた細胞遊走アッセイを行った結果、BSA-FLの濃度依存的な遊走を示し、BSA-FL濃度勾配が水平方向に生じる系で遊走を観察した場合でも、BSA-FLの濃度勾配に応答して細胞が遊走することが示された (図3)。以上の結果から、S-Fmsは増殖および遊走シグナルを伝達しうることを示され (growth/

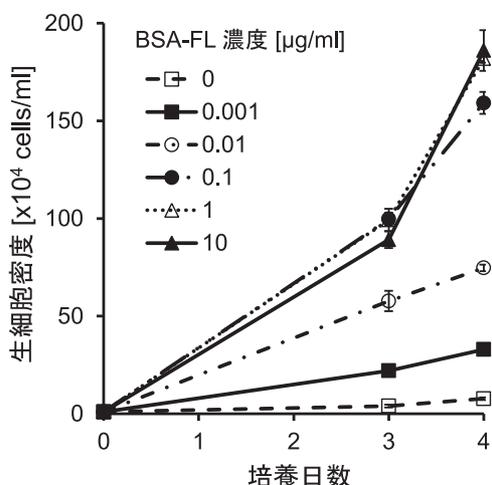


図2. FDC/S-Fms細胞の増殖アッセイ結果 (初期細胞密度:  $1 \times 10^4$  cells/ml)

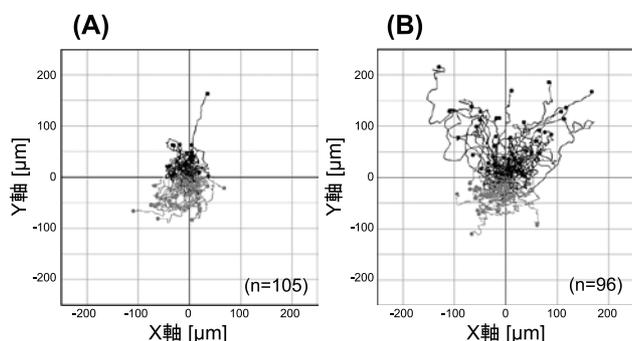


図3. FDC/S-Fms細胞の水平方向遊走アッセイ結果. (A) 濃度勾配なし (B) 50 µg/ml BSA-FLを添加しY軸正方向にBSA-FL濃度勾配を生じさせた条件.

migration signalobody), 有用な血球細胞を安価に大スケールで生産する系や, 組織再生や免疫応答における細胞遊走の人為的制御への応用が期待される.

再生医療や遺伝子治療においては, 移植後の細胞が万一がん化した場合に, 移植細胞を選択的に細胞死に導いて除去できる技術も必要である. これまでにさまざまな細胞死誘導系が開発されてきたものの<sup>4,6)</sup>, いずれの系でも使用可能な細胞死誘導剤は限定されており, 副作用の報告もある. 一方, signalobodyは無数の抗原-抗体系の中から副作用の少ない抗原を細胞死誘導剤として選べる可能性があり, 細胞死誘導系としても有用であると考えた. そこで, 死シグナル伝達に参与している受容体 Fasを用いた signalobody (S-Fas) を構築した<sup>7)</sup>. S-Fas をマウス pro-B細胞株 Ba/F3にて発現させたところ (Ba/S-Fms), 特異的抗原である BSA-FL濃度依存的に細胞死を誘導でき (図4), BSA-FL添加後30分で Fasの下流シグナル伝達分子である caspase-3の活性化, すなわち

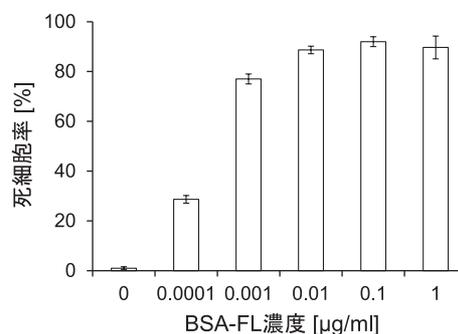


図4. Ba/S-Fas細胞の死誘導アッセイ結果

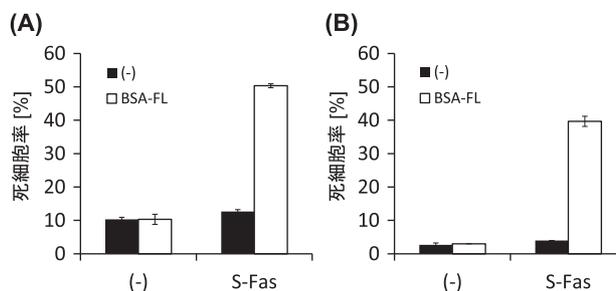


図5. S-Fas発現がん細胞株の死誘導アッセイ結果. (A) K562細胞 (B) HeLa細胞. BSA-FL: 1 µg/ml.

アポトーシスシグナルの活性化が見られ, 迅速に細胞死シグナルが伝達されていることが分かった. さらに, S-Fasをヒト骨髄性白血病細胞株K562, ヒト子宮頸がん細胞株HeLaにて発現させた結果, いずれの細胞株に対しても BSA-FL 依存的に細胞死を誘導できた (図5). 以上より, 死シグナル伝達抗体 (death signalobody) を実証することができた.

### 細胞内タンパク質間相互作用の検出法: KIPPIS

生きた細胞内の多くのプロセスはタンパク質間相互作用 (PPI) によって成り立っている. したがって, 生きた細胞内で PPIを検出することは, 細胞内の複雑なプロセスの理解のみならず, それをもとにした合理的な創薬開発においても重要である.

既往の生細胞内 PPI 検出法としては, ツーハイブリッド法や protein fragment complementation assay (PCA) 法などがあるが, 最終的な検出時のリードアウトは蛍光や発光であることが多く, それに起因するバックグラウンドに加えて, 相互作用を検出したい分子にレポーター分子を融合することに起因するコンフォメーションの影響があり, あらゆる PPI に適用可能な汎用性を担保するのは困難である<sup>8,9)</sup>. したがって, 検出原理の異なる PPI 検出法の開発が求められている.

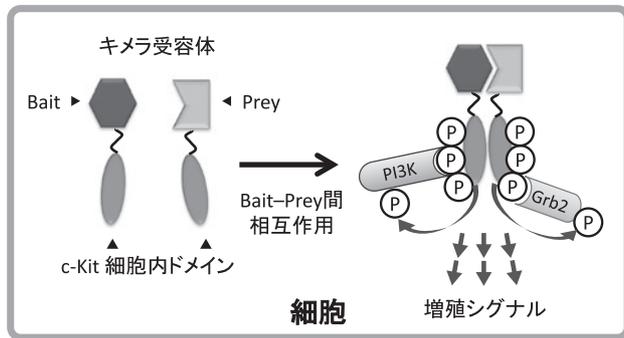
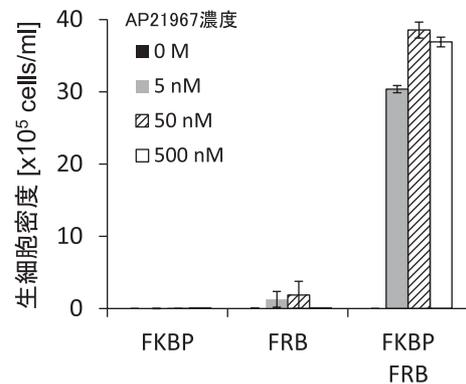
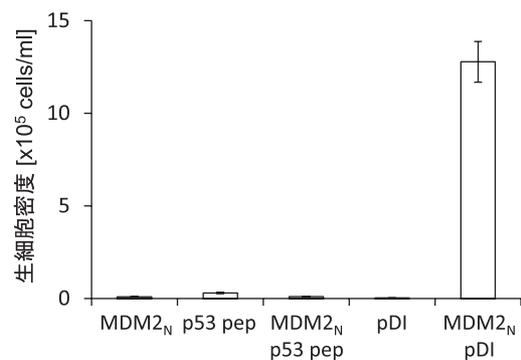


図6. KIPPISの概念図

そこで、筆者らは受容体由来の増殖シグナルをPPI検出のリードアウトとする系を考案した<sup>10)</sup>。本系では、増殖シグナルを伝達する幹細胞因子受容体 (c-Kit) の細胞内ドメインを、相互作用を検出したいタンパク質 (bait と prey) に連結したキメラ受容体を細胞で共発現させる (図6)。Bait-prey間に相互作用が生じたときのみc-Kit細胞内ドメインが二量体を形成して活性化され、増殖シグナルを伝達する。この系を発現させるための宿主細胞としてインターロイキン-3 (IL-3) 依存性細胞株を使えば、IL-3を除去して培養したときに、PPIに起因するc-Kitキメラの増殖シグナルが伝達されたときのみ細胞が増殖するという明確なリードアウトを実現できる。筆者らは本系をc-Kit-based protein-protein interaction screening (KIPPIS) と命名した。

KIPPISの原理を実証するために、合成小分子リガンドであるAP21967に反応して相互作用するFK506-binding protein 12 (FKBP) とFKBP12-rapamycin binding domain of FRAP (FRB) のT2098L変異体をbait, preyとして用い、c-Kit細胞内ドメインのN末端側にbait, preyを連結したキメラ受容体発現ベクターを構築した。IL-3依存性Ba/F3細胞にてこれらのキメラ受容体を発現させ、IL-3非存在下で培養したところ、bait, preyキメラ単独発現細胞では増殖せず、共発現細胞ではAP21967依存的に増殖したことから、原理の実証に成功した (図7)。

そこで、タンパク質間相互作用阻害ペプチドの評価系への応用可能性を検証するために、より短いペプチドとタンパク質由来ドメイン間の相互作用を検出できるかどうかを検証することにした。ユビキチンリガーゼMDM2はがん抑制タンパク質p53と結合し、その分解を誘導する。p53タンパク質の中でMDM2のN末端ドメイン (MDM2<sub>N</sub>) との結合部位であるp53 pep ( $K_d = 140$  nM) が同定されており、MDM2に対してp53 pepよりも高

図7. FKBP, FRBキメラ発現細胞の増殖アッセイ結果 (初期細胞密度:  $1 \times 10^5$  cells/ml, 培養6日目)図8. MDM2<sub>N</sub>, p53 pep, pDIキメラ発現細胞の増殖アッセイ結果 (初期細胞密度:  $1 \times 10^5$  cells/ml, 培養2日目)

い親和性を示すpDI ( $K_d = 19.6$  nM) は、MDM2-p53タンパク質間の相互作用を阻害することが可能であり、抗がん作用を示す<sup>11)</sup>。そこで、c-Kit細胞内ドメインのN末端側にMDM2<sub>N</sub>, p53 pep, pDIをそれぞれ連結したキメラ受容体発現ベクターを構築し、Ba/F3細胞で発現させてIL-3非存在下で培養した。その結果、MDM2<sub>N</sub>キメラ/p53 pepキメラ共発現細胞は増殖しなかったが、MDM2<sub>N</sub>キメラ/pDIキメラ共発現細胞は増殖した (図8)。したがって、増殖というリードアウトによって、2種類のペプチドのMDM2<sub>N</sub>に対する親和性を見分けることができたことになる。さらに、MDM2<sub>N</sub>キメラ/p53 pepキメラ共発現細胞と、MDM2<sub>N</sub>キメラ/pDIキメラ共発現細胞をさまざまな比率で混合し、IL-3非存在下で培養したところ、後者の細胞群が濃縮されたことから、本系の高親和性ペプチドスクリーニングへの応用可能性が示唆された。

### おわりに

本稿では、受容体のリガンド認識部位を改変し、シグナル伝達の「入力」を操ることで細胞運命制御やタンパ

ク質間相互作用検出に応用した研究について紹介した。一方、筆者らは受容体のシグナル伝達特性を司るシグナル伝達ドメインをモチーフ単位で改変し、シグナル伝達の「出力」を操る研究も進めている<sup>12-14)</sup>。このような二つの観点を組み合わせることにより、再生医療や創薬への応用に資する多くのプラットフォームが生まれることを期待している。

## 謝 辞

本稿に記載した実験結果は主に東京大学長棟研究室の人見梓氏、戸根悠一郎氏、間部悟氏によるものであり、恩師である長棟輝行先生（東京大学）、上田宏先生（東京工業大学）のご指導を受けながら研究を進めることができました。ここに厚く感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Kawahara, M. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **48**, 283 (2010).
- 2) Kawahara, M. and Nagamune, T.: *Curr. Opin. Chem. Eng.*, **1**, 411 (2012).
- 3) Kawahara, M. *et al.*: *Biotechnol. J.*, **9**, 954 (2014).
- 4) Barba, D. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4348 (1994).
- 5) Chu, Y. *et al.*: *Genesis*, **46**, 530 (2008).
- 6) Di Stasi, A. *et al.*: *New Engl. J. Med.*, **365**, 1673 (2011).
- 7) Tone, Y. *et al.*: *Hum. Gene Ther. Methods*, **24**, 141 (2013).
- 8) Stynen, B. *et al.*: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **76**, 331 (2012).
- 9) Grunberg, R. *et al.*: *Nat. Methods*, **10**, 1021 (2013).
- 10) Mabe, S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 6127 (2014).
- 11) Pazgier, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4665 (2009).
- 12) Saka, K. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 1528 (2012).
- 13) Saka, K. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 3197 (2013).
- 14) Saka, K. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 948 (2014).