

2016年度 生物工学奨励賞（照井賞） 受賞



# キメラ受容体による細胞運命 制御系の構築とライブラリー 選択への応用

河原 正浩



## *Development of a cell fate controlling system using chimeric receptors and application to library screening*

Masahiro Kawahara (*Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656*) *Seibutsukogaku* **95**: 127-135, 2017.

### はじめに

誘導多能性幹細胞（iPS細胞）の開発は、細胞生物学はもとより細胞の医療応用分野において大きなインパクトを与え、近年のゲノム編集技術の革新も相まって、各種多能性幹細胞を利用した再生医療や遺伝子治療の実用化には大きな期待が寄せられている。一方で、細胞の医療応用を産業として成立させるためには、治療に供する細胞を再現性良く均質に、しかも大量に調製する技術が必要となる。この課題に対しては、コスト面も含めて効率的に種々の細胞を自在に調製するための技術革新が必要となるであろう。また、安全な細胞医療を実現するためには、治療に供する細胞の運命を生体外・生体内問わず簡便に制御する技術が必要とされている。このように、細胞医療分野では、現在まさに生物化学工学的な視点が重要となってきている<sup>1)</sup>。

筆者は、動物細胞表面に膜貫通タンパク質として発現し、特異的リガンドを受容して細胞内シグナル伝達を誘導することで細胞運命制御に重要な役割を果たしているサイトカイン受容体に着目した。このサイトカイン受容体のリガンド認識能をタンパク質工学的な視点で改変した人工受容体を創製することで、特定の細胞の運命を意のままに制御できるのではないかと考えた<sup>2,3)</sup>。まず、サイトカイン受容体のリガンド認識ドメインを一本鎖抗体で置き換え、天然型受容体が認識し得ない特異的抗原

を認識して細胞内シグナル伝達を行うキメラ受容体を創製した。このキメラ受容体においては、人工リガンド認識系として多様性を持つ抗原・抗体ペアを選んだ点の特徴であり、各種抗原認識キメラ受容体を合理的に設計することにより、増殖・分化・遊走・死などの多様な細胞運命を複数の抗原をスイッチとして用いて自在にコントロールできる可能性がある。また、細胞培養や細胞分化誘導に必須の各種サイトカインは1 mgあたり数十万円以上の高価なものがほとんどであるが、細胞増殖や分化を誘導するキメラ受容体を活性化するための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目的細胞を大量かつ安価に調製するためのプラットフォーム技術にもなりうる。

一方、創薬分野に目を転じると、世界の医薬品市場では売上高の上位を抗体医薬品が占める時代となり、副作用の低い分子標的医薬品として抗体医薬品のニーズは今後も増していき、市場はさらに拡大していくことが予想されている<sup>4)</sup>。また、あらゆる細胞内プロセス制御の根幹ともいえるタンパク質間相互作用を標的とした創薬が近年注目されており、医療応用に有用な分子を簡便にスクリーニングできる手法の開発が求められている<sup>5)</sup>。そこで、キメラ受容体による細胞運命制御の概念を応用して、細胞運命を指標とした細胞内外での抗体スクリーニングやタンパク質間相互作用スクリーニング系を開発した。具体的には、増殖シグナルを伝達する受容体のリガンド

著者紹介 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻（准教授） E-mail: kawahara@bio.t.u-tokyo.ac.jp

認識部位を一本鎖抗体ライブラリーで置き換えたキメラ受容体を細胞で発現させ、標的抗原存在下での細胞増殖を指標として細胞内外で抗原結合性抗体が選択できることを実証した。また、受容体を抗体以外のタンパク質と連結したキメラ受容体も構築し、細胞内でのタンパク質間相互作用のスクリーニング系へと研究を発展させた。

本稿では、筆者らが取り組んできたこれらの研究の成果について概説する。

## 1. キメラ受容体による細胞運命制御系の構築

細胞運命の人工制御系を構築するにあたり、まずは細胞運命制御に関わる分子とその作用メカニズムに着目した。サイトカインは細胞間シグナル伝達を媒介するタンパク質因子の総称であり、動物細胞の運命制御に大きく関わっている。サイトカインをリガンドとして受容し、細胞内にシグナルを伝達するサイトカイン受容体スーパーファミリーは、その構造的特徴から、(1) タイプI/IIサイトカイン受容体ファミリー、(2) 免疫グロブリンスーパーファミリー、(3) 腫瘍壊死因子受容体ファミリー、(4) ケモカイン受容体ファミリー、(5) TGF- $\beta$ 受容体ファミリー、の5種類に大別される。このうち、(1)に含まれるタイプIサイトカイン受容体ファミリーと(2)に含まれる受容体チロシンキナーゼには多くの種類が存在し、増殖、分化、遊走を司る重要な受容体を含む。また、(3)は主に細胞死を誘導する受容体を含む。したがって、サイトカイン受容体スーパーファミリーのうち、これらの受容体ファミリーをエンジニアリングできれば、細胞運命の根幹ともいえる増殖、分化、遊走、死を意のままに操れる可能性がある。これらの受容体ファミリーはすべて1回膜貫通型の受容体であり、リガンドであるサイトカインを細胞外ドメインで受容し、その際に受容体鎖が二量体以上のオリゴマーを形成することで活性化され、下流にシグナルを伝達する。したがって、これらの受容体をエンジニアリングする際のポイントは、この共通動作原理を可能な限り模倣することにあると考えた。

**1-1. 増殖制御** 再生医療の産業応用には、標的とする組織にもよるが多数の細胞が必要であり、安価な細胞増殖促進技術の確立が欠かせない。そこで、細胞運命の中でまず「増殖」の安価な制御を指向して受容体の改変に取り組んだ。その基本戦略は、受容体のリガンド認識部位を一本鎖抗体 (scFv) に置換し、高価なサイトカインと引き換えに、安価な抗原を新たなリガンドとして認識するキメラ受容体を構築する、というものである (図1)。先に述べたように、ここで用いる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、構築されたキメラ受容体はオリゴマー抗原を加えることでオリ

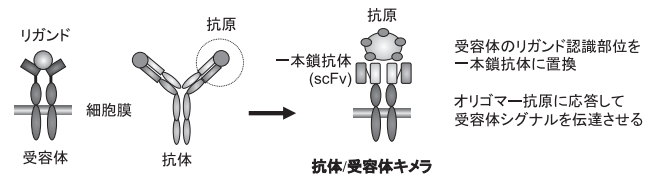


図1. 抗体/受容体キメラの分子デザイン

ゴマー化され活性化されるであろうと考えた。

これを実証するために、タイプIサイトカイン受容体の一つであるエリスロポエチン (EpoR) の細胞外ドメインに着目した<sup>6)</sup>。これは、細胞外ドメイン数が少なく(二つのドメイン)、そのうちのN末端側のD1ドメインにリガンドであるEpoを結合することが分かっており、エンジニアリングがしやすいと考えたためである。このEpoRのD1ドメインを抗フルオレセイン (FL) scFvで置換し、膜貫通および細胞内ドメインをインターロイキン (IL)-6受容体のシグナル伝達サブユニット gp130に置換したキメラ受容体 (S-gp130) 発現ベクターを構築し、マウスIL-3依存性pro-B細胞株Ba/F3に遺伝子導入した。この細胞株を増殖能評価に用いた理由としては、第1に、この細胞が増殖するために必要なIL-3の受容体自体がタイプIサイトカイン受容体ファミリーに属するため、その下流で働くシグナル伝達分子の発現が担保されていることがあげられる。実際、IL-3受容体以外の天然型のタイプIサイトカイン受容体を導入することで、対応するリガンドに反応して増殖させられることがすでに示されていた<sup>7-9)</sup>。第2に、Ba/F3細胞はIL-3を除去して培養すると完全に死滅するため、IL-3を除去し抗原を添加したときの増殖の有無で、キメラ受容体の増殖誘導能を明確に判定できることがあげられる。

実際に増殖アッセイを行った結果、抗原としてFLを複数結合させたBSA (BSA-FL) を用いて、抗原依存的な細胞増殖を誘導できた<sup>10)</sup>。このとき、FLモノマーやBSA単体では細胞増殖を示さなかった。また、5'末端がFLラベルされた回文配列を持つオリゴDNAをアニーリングさせて作製したFL二量体を用いても、細胞増殖を誘導することができた。さらに、上述のデザインではキメラ受容体の細胞外ドメインにD2ドメインのみを残していたが、(1) D1, D2ドメイン両方を残したものの、(2) D1ドメインのみを残したものの、(3) D1, D2ドメイン両方とも除去したもののも作製した結果、(1)、(3)でも抗原依存的な細胞増殖が誘導できることが分かった<sup>11)</sup>。さらに、細胞外ドメインのみならず、受容体鎖間相互作用を司る膜貫通ドメインへの変異導入、および細胞内の膜近傍ドメインへのオリゴアラニンリンカー挿入による受容体配向の調整により、抗原依存的なシグ

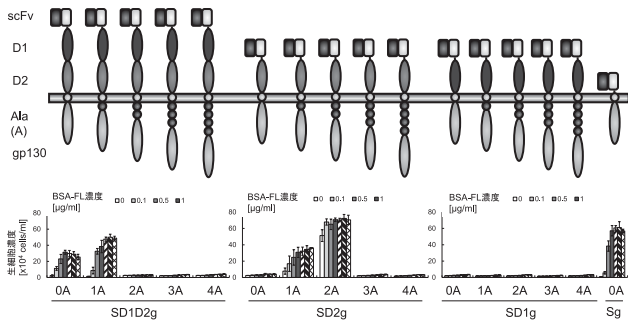


図2. 厳格な抗原依存的増殖を達成するためのS-gp130キメラ受容体構造の最適化

ナル伝達のON/OFFをより厳格になるように改良できた(図2)<sup>11,12)</sup>。サイトカイン受容体の活性化には二量体化のみならずコンフォメーションが重要であるという報告が数多くなされており<sup>13-15)</sup>、筆者らの実験結果もそれに一致した。以上より、オリゴマー抗原によってscFv-受容体キメラをオリゴマー化させシグナル伝達を誘導するという本系の原理証明に成功した。

次に、本系の他の受容体への適用可能性を示すために、D2ドメインを持つキメラ受容体の膜貫通および細胞内ドメインを別の増殖誘導型受容体のものに置換したキメラ受容体を構築し、同様にBa/F3細胞で発現させて機能性を検証することにした。タイプIサイトカイン受容体であるEpoR、IL-2受容体(IL-2R)、トロンボポエチン受容体(c-Mpl)、受容体チロシンキナーゼである上皮成長因子受容体(EGFR)、マクロファージコロニー刺激因子受容体(c-Fms)、幹細胞因子受容体(c-Kit)、インスリン受容体(IR)をシグナル伝達ドメインとして持つキメラ受容体(それぞれS-EpoR、S-IL-2R、S-Mpl、S-EGFR、S-Fms、S-Kit、S-IR)発現ベクターを構築し、Ba/F3細胞に導入した。その結果、抗原非依存的な増殖が見られたキメラ受容体もあったが、いずれも前段落で述べたドメインエンジニアリングを施すことにより抗原依存的な増殖シグナルを伝達できることが示された<sup>16-21)</sup>。また、シグナル伝達解析の結果、それぞれのキメラ受容体に対応する天然型受容体が活性化する主要なシグナル伝達経路を活性化できていることも分かった。以上より、本系はタイプIサイトカイン受容体や受容体チロシンキナーゼに広く適用可能な技術であることが示された。

以上で述べた研究では、シグナル伝達解析に適したマウスリンパ球系の前駆細胞株Ba/F3でキメラ受容体の機能性を示したが、他の細胞株や、治療用細胞に近い初代培養細胞にも適用できるかについて検証した。S-EGFR、S-Fms、S-IRをマウス線維芽細胞株NIH3T3に導入し、

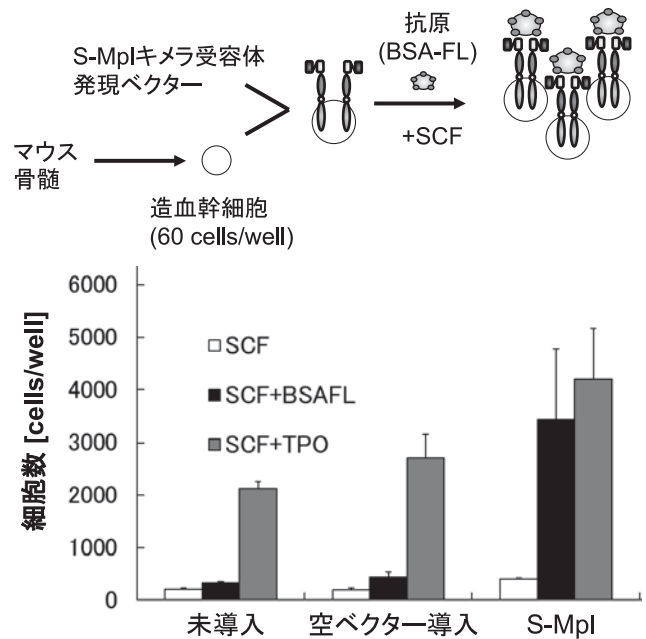


図3. S-Mplキメラによる造血幹細胞の増殖誘導

いずれも抗原存在下で増殖シグナルを伝達できることが示された<sup>19,21)</sup>。また、S-Fmsをマウス骨髄系細胞株FDC-P1に導入したところ、抗原依存的な増殖シグナルが伝達された<sup>22)</sup>。また、S-IL-2Rをマウス細胞傷害性T細胞株CTLL-2、マウス脾臓由来初代培養T細胞に導入したところ、この場合も抗原依存的に細胞増殖を促進できた<sup>17)</sup>。さらに、血球系細胞の源である造血幹細胞は、未だ安定的に体外増幅する技術が確立されていないものの、血球系疾患の治療には欠かせない魅力的な細胞であることから、造血幹細胞へのキメラ受容体の適用可能性を検証した。マウス造血幹細胞はc-Mplとc-Kitの二つのシグナルが共存することにより増殖が促進されることが知られている<sup>23,24)</sup>。このうちc-Mplのシグナルをキメラ受容体で代用できるかを検証した。S-Mplをマウス骨髄から純化した初代培養造血幹細胞に導入したところ、c-Kitリガンドと抗原の共存下で顕著な増殖が確認された<sup>18,25)</sup>。その増殖レベルは天然型サイトカインであるc-Kitリガンドとc-Mplリガンド共存下での増殖と比べ遜色のないものであった(図3)。また、このようにして体外にて抗原存在下で培養された細胞を放射線照射マウスに移植した結果、骨髄再構築能が示されたことから、体外でキメラ受容体のシグナルによって増殖した細胞が造血幹細胞としての機能を維持していることが分かった。

**1-2. 遊走制御** 以上の結果より、細胞運命のうち増殖をキメラ受容体により制御できることが示された。そこで、増殖以外の細胞運命にも適用できるかを検証した。まずは遊走制御について紹介したい。細胞遊走は生



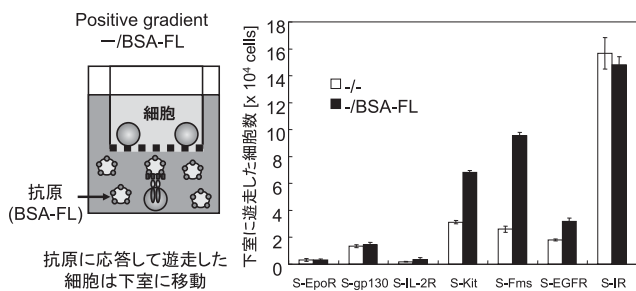


図4. 各キメラ導入Ba/F3細胞の遊走アッセイ結果

体内における組織再生や免疫応答で重要な役割を果たしており、遊走を人為的に制御できれば細胞治療への応用が期待される。タイプIサイトカイン受容体や受容体チロシンキナーゼは、その発現細胞にもよるが増殖以外に遊走シグナルも伝達することが知られている。そこで、Ba/F3細胞に各キメラ受容体を発現させた細胞を用いて、ケモタキシスチャンパーによる細胞遊走アッセイを行ったところ、S-Fms, S-Kit, S-EGFR発現細胞が抗原の濃度勾配に反応して遊走することが示された(図4)<sup>26)</sup>。この中で特にS-Fmsが方向性を持った遊走レベルが高く、Ba/F3細胞以外にFDC-P1細胞でも抗原の濃度勾配方向への遊走を確認することができた<sup>22)</sup>。一方、S-Mpl発現細胞は抗原の濃度勾配に反応した遊走は見られなかったものの、抗原依存的な細胞運動性の顕著な亢進が見られた<sup>27,28)</sup>。以上より、細胞遊走シグナルもキメラ受容体によって模倣できることが示された。

**1-3. 分化制御** 生きた細胞における重要な細胞運命として、増殖・遊走の他に分化があげられる。再生医療用細胞を調製する際には、増殖により十分な細胞数を確保することも重要だが、目的の細胞に効率的かつ安価に分化誘導させることも重要である。低分子化合物の添加や、転写因子の遺伝子導入による分化法も報告されているが<sup>29-32)</sup>、ほとんどの場合、分化誘導にも高価なサイトカインが使われており、そのコストを低減させることが産業応用に向けて重要である。そこで、キメラ受容体のシグナル伝達ドメインに分化シグナルを伝達する受容体を選び、安価な抗原に反応して分化シグナルを伝達できるかを検証した。腫瘍壊死因子受容体ファミリーに属するreceptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK)は、マクロファージ様細胞株RAW264の細胞膜上に発現し、RANKリガンド(RANKL)を培地に添加すると破骨細胞に分化する<sup>33)</sup>。そこで、RANKをシグナル伝達ドメインとして持つキメラ受容体(S-RANK)の発現ベクターを構築した。RAW264細胞に遺伝子導入して発現させ、キメラ受容体発現細胞を抗原刺激し、破骨細胞の分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ

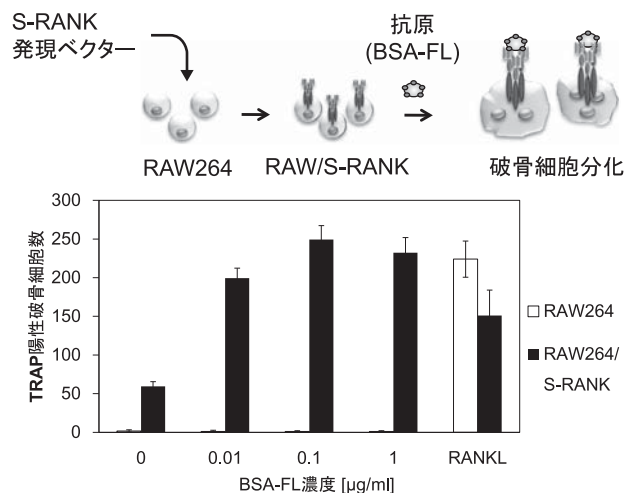


図5. S-RANKキメラ導入RAW264細胞の破骨細胞への分化誘導

(TRAP)の染色により分化能を検証した。その結果、抗原濃度依存的に破骨細胞への分化細胞数が増加し、親株のRAW264細胞を天然型サイトカインであるRANKLで刺激した場合とほぼ同等の分化効率を達成できた(図5)<sup>34)</sup>。また、シグナル伝達解析の結果、天然型RANKが活性化するNF- $\kappa$ B経路とMAPキナーゼ経路をキメラ受容体も同等に活性化していたことから、キメラ受容体はRANKの活性化を模倣できることが示された。さらに、筆者らの最近の研究では、骨髄系前駆細胞株32Dcl3の顆粒球分化に着目した研究も行っている。32Dcl3細胞は、タイプIサイトカイン受容体に属する顆粒球コロニー刺激因子受容体(G-CSFR)を発現し、そのリガンドであるG-CSFを受容して顆粒球へ分化する<sup>35)</sup>。そこで、G-CSFRをシグナル伝達ドメインとして持つキメラ受容体(S-GCSFR)発現ベクターを構築し、32Dcl3細胞に導入して発現させたところ、抗原刺激により顆粒球分化を誘導することができた。以上より、本系は医療応用に近い分化細胞を前駆細胞から生産する技術として応用できる可能性がある。

**1-4. 死制御** 最後に、標的細胞の除去、すなわち細胞死の模倣について紹介する。細胞治療においては、生体内に移植した細胞による治療効果が得られることも重要であるが、移植細胞が仮に不要となった場合にも除去できることが望ましい。たとえば、移植細胞に何らかの変異が生じ、異常増殖するなど悪性化してしまった場合でも、細胞死を誘導して取り除くことができれば、細胞治療の安全性は担保される。そこで、腫瘍壊死因子受容体ファミリーに属し、死シグナル伝達を担う受容体Fasをシグナル伝達ドメインとして持つキメラ受容体(S-Fas)の発現ベクターを構築した。まずBa/F3細胞に

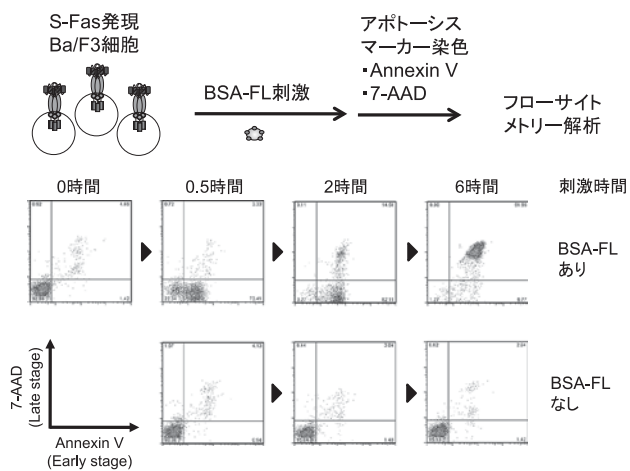


図6. S-Fas キメラ導入 Ba/F3 細胞のアポトーシス誘導

導入して機能評価したところ、抗原依存的かつ抗原刺激時間依存的な細胞死が見られ(図6)、Fas下流のアポトーシス実行役のカパーゼ3の活性化も見られた<sup>36)</sup>。そこで、S-Fasをヒトのがん細胞株であるK562やHeLa細胞に導入したところ、両細胞株に対して抗原依存的に死を誘導できることが示された。したがって、細胞死シグナルもキメラ受容体によって制御できることが示された。

以上をまとめると、キメラ受容体によって三つの受容体ファミリーの計10種類の受容体のシグナル伝達を模倣でき、その結果、細胞運命の要諦である増殖・分化・遊走・死の制御に成功した。そこでこれらのキメラ受容体をシグナル伝達抗体(signalobody)と命名した。

## 2. キメラ受容体によるライブラリー選択への応用

上述のキメラ受容体を用いた細胞運命制御の研究は、相互作用することが既知の抗原と抗体のペアを用い、抗原の存在の有無によってキメラ受容体のタンパク質間相互作用を制御し、その結果、特定の細胞運命制御を実現する、というコンセプトであった。このような研究を進めていく過程で、その逆、すなわち、細胞運命が誘導されたことを指標として、未知のタンパク質間相互作用の有無を検出できないか、という逆転の発想に至った。抗原-抗体系であれば、キメラ受容体の抗体部分をライブラリー化しておき、特定の抗原に対して結合する抗体クローンをスクリーニングできると考えられ、抗体医薬創出のためのプラットフォームとして有用性がある。また、細胞内の多くのプロセスは複雑なタンパク質間相互作用ネットワークによって運営されていることから、生きた細胞内でタンパク質間相互作用を検出する技術は、細胞内プロセスの理解とそれを基にした創薬を推進するにあたってきわめて重要である。したがって、この発想の転

換は、再生医療への応用を指向したキメラ受容体の研究を、創薬指向へも展開することにより大きく可能性を広げるものになった。

細胞運命を指標とするにあたって、増殖の有無は、適切な培養プレートへの播種と細胞の培養という非常に簡便な操作で、リードアウトとしても特別な装置も要らずに判別できるため簡便であると考えた。これまでのキメラ受容体の研究で使用していたBa/F3細胞は、厳格なIL-3依存性を持つため、IL-3非存在下での細胞増殖とキメラ受容体の活性化は明確な相関を示す。このため、スクリーニングに非常に適した宿主細胞であると考えた。

### 2-1. 細胞表面での抗体選択法

そこで、まずは特定の抗原に対する抗体断片をライブラリーからスクリーニングできるかを検証した。既存の*in vitro*抗体選択法に比べたキメラ受容体による抗体スクリーニング系の利点は、抗体分子の翻訳後修飾や折りたたみに適した動物細胞での発現系を利用したうえで、非特異的クローンを除くために既往の系で必須の操作であるパンニングやソーティングが不要である点があげられる。また、得られた細胞からのゲノムPCRによる抗体遺伝子のクローニングも可能であり、他の*in vitro*抗体選択法と同様に表現型と遺伝子型の対応付けも可能である。

増殖誘導型キメラ受容体の中で、gp130をシグナル伝達ドメインとして持つキメラ受容体については、ドメインエンジニアリングにより最適化を行うことで、細胞外ドメインにEpoRのD1, D2ドメイン両方を残したキメラ受容体構造(SD1D2g)と、D1, D2ドメイン両方を削除したキメラ受容体構造(Sg)による厳格な抗原依存的な増殖を達成できていた<sup>11)</sup>。そこで、SD1D2g, SgのscFv部分にヒト合成scFvライブラリーを組み込んだキメラ受容体発現ベクターライブラリーを作製し、Ba/F3細胞に導入した。この細胞群を、IL-3を除き、抗原としてBSA-FLを添加した培地中で選択培養した結果、Sg骨格では、多くの細胞クローンが増殖したが、抗原に対して親和性の低い抗体クローンしか得られなかった<sup>37)</sup>。一方、SD1D2g骨格では、増殖した細胞クローンの数は少なかったものの、抗原に対して親和性の高い抗体クローンが得られた(図7)<sup>38)</sup>。このことから、scFv部分をライブラリー化した場合、キメラ受容体のドメイン構造が抗体スクリーニングの結果を大きく左右することが分かった。SD1D2gから得られた増殖速度の速かった23クローンのシーケンス解析を行った結果、7種類のクローン配列が得られ、そのうちもっとも高い抗原親和性を持つクローン配列が17個取得されていた。このことから、本手法では高親和性の抗原結合性scFvクローン

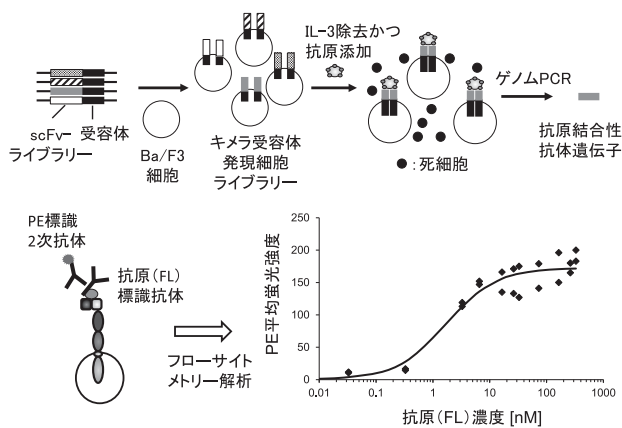


図7. キメラ受容体による細胞表面での抗体ライブラリー選択法概念図と代表的クローンの抗原結合性評価

を優先的に取得できることが示された。

**2-2. 細胞内抗体選択法** 以上より、細胞膜発現型のキメラ受容体によって、外部から加えた抗原に結合するscFvをスクリーニングできることが分かった。一方で、細胞内タンパク質抗原を標的とした抗体によって、標的抗原の機能阻害や可視化解析への応用を指向する場合には、細胞内で機能を発揮する抗体 (intrabody) をスクリーニングする必要がある<sup>39)</sup>。既存の抗体選択法では、細胞外の酸化的環境下で選択されるため、選択された抗体の大部分は、細胞内の還元的環境下では不安定である。したがって、細胞内で機能するintrabodyをさらに別途アッセイを行って選抜する必要があるが、動物細胞内においてintrabodyをライブラリーから選択するための汎用的な手法は未だ確立されていない。

そこで、これまで細胞膜上で発現させていた増殖誘導型キメラ受容体を思い切って細胞質で発現させ、標的抗原オリゴマーも細胞質で過剰発現させることによって、標的抗原に結合するintrabodyを細胞増殖により選択できないか考えた。具体的な実験としては、ヒト合成scFvライブラリーと受容体チロシンキナーゼc-Kitの細胞内ドメインを連結したキメラ受容体遺伝子を作製し、標的抗原として二量体抗原である狂犬病ウイルスリジン酸化 (P) タンパク質を過剰発現させたBa/F3細胞に導入して細胞質で発現させた。得られた細胞ライブラリーをIL-3非存在下で培養し、増殖する細胞をスクリーニングしたところ、抗原であるPタンパク質依存的な増殖が見られた<sup>40)</sup>。そこで、増殖速度の速かった24クローンを選びシーケンス確認を行った結果、異なる四つのscFvクローンの配列が得られた。これらのscFvクローンの配列をキメラ受容体発現ベクターに再度組み込み、抗原であるPタンパク質発現Ba/F3細胞と親株Ba/F3細胞に導入してIL-3非存在下での増殖アッセイを行った

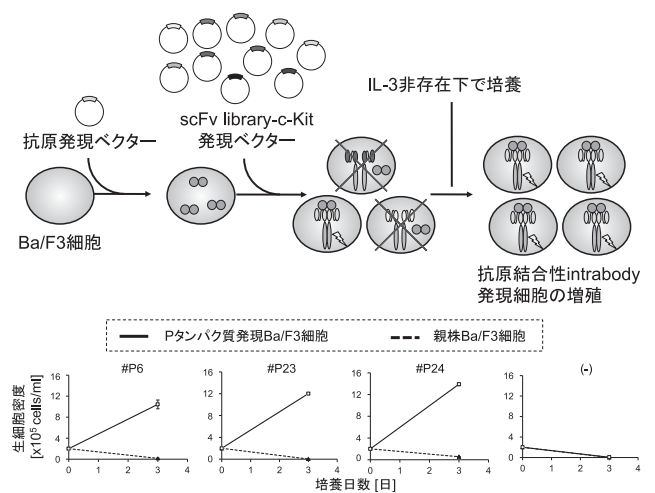


図8. キメラ受容体による細胞内抗体ライブラリー選択法概念図と得られたクローンの抗原特異性評価

結果、いずれも抗原発現細胞でのみ増殖した (図8)。また、キメラ受容体のc-Kit細胞内ドメインは抗原依存的にチロシンリン酸化されており、プルダウンアッセイの結果、抗原とキメラ受容体の共沈が見られたことから、これら4種類のscFvはすべて抗原結合性があることが確認された。このことから、本研究の系を用いて動物細胞の細胞質にて機能するintrabodyをライブラリーから直接スクリーニングできることが示された。

**2-3. 細胞内タンパク質間相互作用スクリーニング法** このように、キメラ受容体による細胞内での抗体スクリーニングが可能となったことから、受容体を抗体以外のタンパク質と融合したキメラを構築することで、細胞内でのさまざまなタンパク質間相互作用 (PPI) の検出法やスクリーニング系への応用へと系を発展させたいと考えた。このPPI検出用の発展型キメラ受容体は、前項で作製したintrabody選択用のscFv-c-KitキメラのscFv部分を、相互作用を検出したいタンパク質 (baitとprey) に置換したものである。検出原理としては、これまでのキメラ受容体システムと同様であり、baitとpreyの間に相互作用が生じたときに、キメラ受容体のc-Kit細胞内ドメインが二量体を形成して活性化され、増殖シグナルが伝達されるので、Ba/F3細胞で発現させればIL-3非存在下での増殖を指標にPPIを検出できる (図9)。

まずは抗体以外のタンパク質への適用可能性を示すために、小分子リガンドAP20187に反応してホモ二量体が形成されるFK506-binding protein 12 (FKBP) のF36V変異体 (FKBP<sub>F36V</sub>) を相互作用タンパク質として選び、c-Kit細胞内ドメインを連結したキメラ受容体発現ベクターを構築した。このとき、c-Kit細胞内ドメインをC末端側またはN末端側に配置した2通りと、FKBP<sub>F36V</sub>



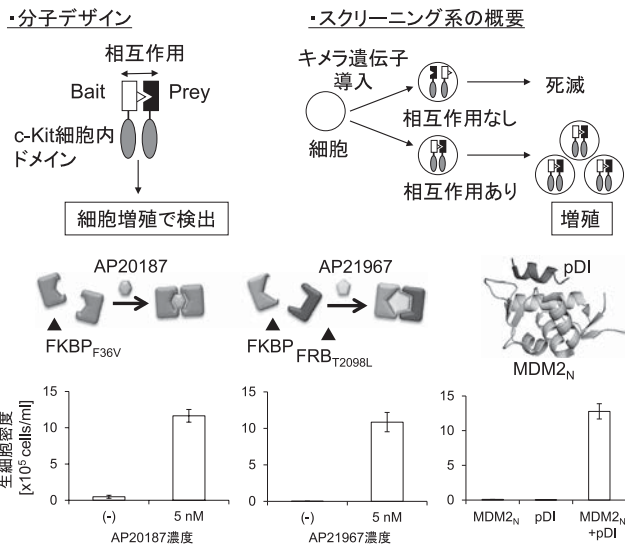


図9. キメラ受容体によるタンパク質間相互作用スクリーニング法の概念図と3種類のタンパク質間相互作用検出結果

とc-Kit細胞内ドメインの間にフレキシブルリンカー(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>2</sub>を挟むか否かの2通りの計4通りのキメラ受容体をデザインした。これらをBa/F3細胞に導入し、IL-3非存在下で種々のリガンドAP20187を添加して培養した。その結果、フレキシブルリンカーを挟んだ方が増殖誘導能は優れており、天然型受容体の活性化モードと同様にc-Kit細胞内ドメインがC末端側にある方が増殖誘導能は優れていた<sup>41)</sup>。また、リガンドであるAP20187非存在下では増殖が生じなかったことから、バックグラウンドが低い系であることが示唆された。

以上より抗体以外のタンパク質であるFKBP<sub>F36V</sub>にキメラ受容体の適用範囲を広げることができたので、次の段階としてヘテロ二量体を形成する二つの異種タンパク質間相互作用を検出できるかについて検討した。FKBPと、mammalian target of rapamycin (mTOR)に含まれるFKBP12-rapamycin binding (FRB)ドメインのT2098L変異体とは、小分子リガンドAP21967に反応して相互作用することが知られている。そこで、FKBPまたはFRB<sub>T2098L</sub>をフレキシブルリンカーを介してc-Kit細胞内ドメインに連結した2種類のキメラ受容体発現ベクターを構築し、Ba/F3細胞に導入して発現させた。その結果、共発現細胞ではリガンドAP21967依存的な増殖が見られ、この時もバックグラウンドが低い検出系を実現することができた<sup>41)</sup>。

そこで次に、リガンド依存的に相互作用するタンパク質ではなく、恒常的に相互作用するケースにも適用できることを示すことにした。がん抑制タンパク質p53に作用するユビキチンリガーゼMDM2のN末端ドメイン(MDM2<sub>N</sub>)と、それに相互作用するpDIペプチドの相

互作用を検出できるか否かについて、同様にキメラ受容体を構築し、Ba/F3細胞で発現させて検証した。その結果、いずれか一方のキメラ受容体発現細胞は増殖しなかったのに対し、二つのキメラ受容体を共発現細胞した細胞は増殖したことから、MDM2<sub>N</sub>とpDIとの相互作用を検出できることが示された<sup>41)</sup>。さらに、MDM2<sub>N</sub>に対する親和性がpDIよりも弱いp53由来ペプチドを連結したキメラ受容体を同様に作製し、MDM2<sub>N</sub>キメラ/pDIキメラ共発現細胞とMDM2<sub>N</sub>キメラ/p53由来ペプチドキメラ共発現細胞を混合して培養したところ、後者の細胞が大多数となるような比率(1:10~1:1000)で混合した場合であっても前者の細胞群が濃縮された。したがって、本系は増殖速度の違いによって、標的タンパク質に対してより高い親和性を持つペプチドをライブラリーからスクリーニングできる可能性が示唆された。

このようなキメラ受容体を用いた手法は、対象として選ぶ標的タンパク質の特性によっては、標的タンパク質に相互作用する分子のみならず、標的タンパク質の相互作用に影響を与える分子のライブラリースクリーニングにも応用できる。この観点で、細胞質型パターン認識受容体の一つであるNOD-like receptor, pyrin domain-containing 3 (NLRP3)を標的タンパク質として選んだ研究について紹介する。NLRP3は自然免疫応答における免疫センサータンパク質として近年その重要性が明らかになってきており、種々の炎症性疾患との関連性が示されてきた。NLRP3は内在性危険因子および環境ストレスに反応してオリゴマー化し、アダプター分子を介してcaspase-1をリクルートした活性型複合体(インフラマソーム)を形成することで、炎症シグナルを伝達すると推測されているが、この過程で関与する細胞内因子の解明も含め、活性化機構には未だ不明な点が多い<sup>42)</sup>。そこで、NLRP3をc-Kitの細胞内ドメインに連結したキメラ受容体を構築し、細胞増殖を指標に活性化因子の探索を行った(図10)。実験では、まずキメラ受容体発現ベクターをBa/F3細胞に導入し安定発現株を取得後、ヒト膵臓由来cDNAライブラリーを導入した。IL-3非存在下で増殖した細胞のゲノムを回収し適切なプライマーを用いてPCRすることで、導入されたcDNA配列部分を増幅しシーケンスを確認後、再度キメラ受容体細胞に導入してNLRP3に対する特異性を解析した。その結果、3種のcDNA導入細胞でNLRP3特異的なキメラ受容体の活性化および増殖促進がみられた<sup>43)</sup>。以上より、標的タンパク質のオリゴマー化状態に影響を与える遺伝子をライブラリーからスクリーニングできることが示された。

以上より、c-Kitキメラによる細胞内PPIスクリーニング法が実証できたことから、本系をc-Kit-based

## 謝 辞

本研究は東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻/バイオエンジニアリング専攻長棟研究室にて行われたものです。長きにわたり熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました長棟輝行先生（東京大学大学院工学系研究科教授）、上田宏先生（東京工業大学科学技術創成研究院教授）に心より厚く御礼申し上げます。また、共同研究でお世話になり異分野の視点から貴重なご助言を賜りました中内啓光先生（東京大学医科学研究所教授）、天津真先生（東京大学医科学研究所准教授）ほか中内研究室の皆様と、井上智先生（国立感染症研究所室長）、加来義浩先生（国立感染症研究所主任研究官）に深く御礼申し上げます。また、研究環境の整備や実験の遂行、結果のディスカッションなどで多大なるご尽力を頂き、本研究を進める過程で苦楽を共にした東京大学長棟研究室のスタッフと多くの学生諸氏に誠に感謝申し上げます。学会でお世話になっております諸先生方も含め、多くの皆様のサポートによって初めて本研究を遂行することができました。本当にありがとうございました。

本研究の一部は、日本学術振興会、生物系特定産業技術研究支援センター、日本医療研究開発機構からの助成を受けて行われました。

## 文 献

- 1) Lipsitz, Y. Y., Timmins, N. E., and Zandstra, P. W.: *Nat. Biotechnol.*, **34**, 393–400 (2016).
- 2) Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T.: *Biochem. Eng. J.*, **48**, 283–294 (2010).
- 3) Kawahara, M. and Nagamune, T.: *Curr. Opin. Chem. Eng.*, **1**, 411–417 (2012).
- 4) Ecker, D. M., Jones, S. D., and Levine, H. L.: *MAbs*, **7**, 9–14 (2015).
- 5) Zinzalla, G. and Thurston, D. E.: *Future Med. Chem.*, **1**, 65–93 (2009).
- 6) Syed, R. S., Reid, S. W., Li, C., Cheetham, J. C., Aoki, K. H., Liu, B., Zhan, H., Osslund, T. D., Chirino, A. J., Zhang, J., Finer-Moore, J., Elliott, S., Sitney, K., Katz, B. A., Matthews, D. J., Wendoloski, J. J., Egrie, J., and Stroud, R. M.: *Nature*, **395**, 511–516 (1998).
- 7) Li, J. P., D'Andrea, A. D., Lodish, H. F., and Baltimore, D.: *Nature*, **343**, 762–764 (1990).
- 8) Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T.: *Cell*, **63**, 1149–1157 (1990).
- 9) Ohashi, H., Kameda, R., Nishikawa, M., Kawagishi, M., and Liu, Y. C.: *Cytotechnology*, **16**, 27–35 (1994).
- 10) Kawahara, M., Kimura, H., Ueda, H., and Nagamune, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 132–138 (2004).
- 11) Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **101**, 975–984 (2008).
- 12) Kawahara, M., Ogo, Y., Ueda, H., and Nagamune, T.: *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 715–719 (2004).
- 13) Muller-Newen, G., Kuster, A., Wijdenes, J., Schaper, F., and Heinrich, P. C.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 4579–4586 (2000).
- 14) Livnah, O., Stura, E. A., Johnson, D. L., Middleton, S. A., Mulcahy, L. S., Wrighton, N. C., Dower, W. J.,

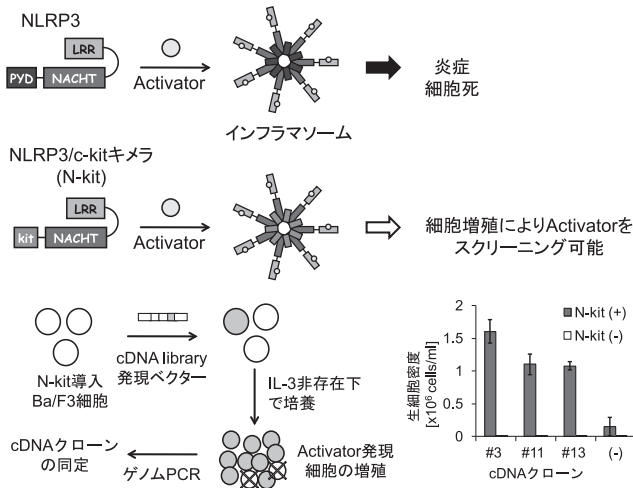


図10. キメラ受容体によるNLRP3活性化因子のスクリーニング

protein–protein interaction screening (KIPPIS) と命名した。

## おわりに

本研究では、遺伝子工学/タンパク質工学を駆使してサイトカイン受容体のリガンド認識部位に改変を加え、特定の人工リガンドに応答した細胞運命制御を実現した。これは人工リガンドとしての抗原とそれに結合することが既知の抗体クローンをを用いた合理的設計に基づく。その成果をもとに、今度は逆に細胞運命（増殖）を指標とすることで、標的結合性が未知のライブラリーから結合性分子を選択する系を考案し、抗体スクリーニングやタンパク質間相互作用スクリーニングを実現した。

今後の展望として、細胞運命制御については単独の細胞運命制御のみならず、複数の細胞運命を連続的に制御することや、それをを用いて実用的に再生医療用細胞を調製できることを実証していくことがあげられる。また、ライブラリースクリーニング系については、疾患関連タンパク質を標的としたタンパク質間相互作用阻害剤あるいは阻害ペプチド探索と、実際の疾患医療への応用があげられる。一方、本稿で記載したリガンド認識部位を改変したキメラ受容体の研究の他にも、受容体のシグナル伝達ドメインを、10アミノ酸残基程度の長さのシグナル伝達分子結合モチーフを複数連結することでボトムアップ的に構築し、シグナル伝達特性自体を人工的にデザインする系についても研究を進めている<sup>44)</sup>。今後、「受容体工学」の方法論をさらにブラッシュアップし、再生医療や創薬開発に貢献する生物化学工学的な基盤技術として確立していきたいと考えている。



- Jolliffe, L. K., and Wilson, I. A.: *Science*, **273**, 464–471 (1996).
- 15) Livnah, O., Johnson, D. L., Stura, E. A., Farrell, F. X., Barbone, F. P., You, Y., Liu, K. D., Goldsmith, M. A., He, W., Krause, C. D., Pestka, S., Jolliffe, L. K., and Wilson, I. A.: *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 993–1004 (1998).
  - 16) Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T.: *J. Biochem.*, **145**, 575–584 (2009).
  - 17) Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., and Nagamune, T.: *Cytokine*, **46**, 127–136 (2009).
  - 18) Kawahara, M., Chen, J., Sogo, T., Teng, J., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., Ueda, H., and Nagamune, T.: *Cytokine*, **55**, 402–408 (2011).
  - 19) Tanaka, K., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T.: *Biotechnol. Prog.*, **25**, 1138–1145 (2009).
  - 20) Kaneko, E., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 641–646 (2012).
  - 21) Nakabayashi, H., Kawahara, M., Tanaka, K., and Nagamune, T.: *Cytotechnology*, **65**, 945–953 (2013).
  - 22) Kawahara, M., Hitomi, A., and Nagamune, T.: *Biotechnol. J.*, **9**, 954–961 (2014).
  - 23) Abboud, M. R., Xu, F., Payne, A., and Laver, J.: *Exp. Hematol.*, **22**, 388–392 (1994).
  - 24) Ohmizono, Y., Sakabe, H., Kimura, T., Tanimukai, S., Matsumura, T., Miyazaki, H., Lyman, S. D., and Sonoda, Y.: *Leukemia*, **11**, 524–530 (1997).
  - 25) Saka, K., Kawahara, M., Teng, J., Otsu, M., Nakauchi, H., and Nagamune, T.: *J. Biotechnol.*, **168**, 659–665 (2013).
  - 26) Kawahara, M., Shimo, Y., Sogo, T., Hitomi, A., Ueda, H., and Nagamune, T.: *J. Biotechnol.*, **133**, 154–161 (2008).
  - 27) Kawahara, M., Hitomi, A., and Nagamune, T.: *Biotechnol. Prog.*, **30**, 411–417 (2014).
  - 28) Yamahira, S., Yamaguchi, S., Kawahara, M., and Nagamune, T.: *Macromol. Biosci.*, **14**, 1670–1676 (2014).
  - 29) Chen, S., Borowiak, M., Fox, J. L., Maehr, R., Osafune, K., Davidow, L., Lam, K., Peng, L. F., Schreiber, S. L., Rubin, L. L., and Melton, D.: *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 258–265 (2009).
  - 30) Borowiak, M., Maehr, R., Chen, S., Chen, A. E., Tang, W., Fox, J. L., Schreiber, S. L., and Melton, D. A.: *Cell Stem Cell*, **4**, 348–358 (2009).
  - 31) Sagal, J., Zhan, X., Xu, J., Tilghman, J., Karuppagounder, S. S., Chen, L., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Laterra, J., and Ying, M.: *Stem Cells Transl. Med.*, **3**, 888–898 (2014).
  - 32) Chalamalasetty, R. B., Garriock, R. J., Dunty, W. C., Jr., Kennedy, M. W., Jailwala, P., Si, H., and Yamaguchi, T. P.: *Development*, **141**, 4285–4297 (2014).
  - 33) Gohda, J., Akiyama, T., Koga, T., Takayanagi, H., Tanaka, S., and Inoue, J.: *EMBO J.*, **24**, 790–799 (2005).
  - 34) Nakabayashi, H., Aoyama, S., Kawahara, M., and Nagamune, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 357–363 (2016).
  - 35) Nakajima, H. and Ihle, J. N.: *Blood*, **98**, 897–905 (2001).
  - 36) Tone, Y., Kawahara, M., Kawaguchi, D., Ueda, H., and Nagamune, T.: *Hum. Gene Ther. Methods*, **24**, 141–150 (2013).
  - 37) Yoshida, R., Kawahara, M., and Nagamune, T.: *J. Biochem.*, **157**, 497–506 (2015).
  - 38) Yoshida, R., Kawahara, M., and Nagamune, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 1170–1179 (2014).
  - 39) Marschall, A. L., Dubel, S., and Boldicke, T.: *mAbs*, **7**, 1010–1035 (2015).
  - 40) Lee, S., Kaku, Y., Inoue, S., Nagamune, T., and Kawahara, M.: *Biotechnol. J.*, **11**, 565–573 (2016).
  - 41) Mabe, S., Nagamune, T., and Kawahara, M.: *Sci. Rep.*, **4**, 6127 (2014).
  - 42) Wen, H., Miao, E. A., and Ting, J. P.: *Immunity*, **39**, 432–441 (2013).
  - 43) Honda, S., Nagamune, T., and Kawahara, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 223–230 (2015).
  - 44) Saka, K., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **109**, 1528–1537 (2012).