

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2006～2009

課題番号：18206083

研究課題名(和文) 人工受容体を用いた樹状細胞の増幅システムの開発とガン治療への応用

研究課題名(英文) Development of artificial receptor-based amplification system of dendritic cells for cancer therapy

研究代表者

長棟 輝行 (NAGAMUNE TERUYUKI)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：20124373

研究分野：細胞工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 / 生物機能・バイオプロセス

キーワード：抗体、受容体、造血前駆細胞、増殖制御、シグナル伝達、がん治療

1. 研究計画の概要

樹状細胞を用いた免疫療法は、免疫系の最初の段階である樹状細胞の抗原提示を利用したもので、他の手法より副作用が少なく、広範かつ強いガン免疫誘導ができることが見込まれている。樹状細胞は骨髄の造血前駆細胞である CD34 陽性細胞に由来し、未熟樹状細胞へと分化して外来抗原を取り込んで提示し、成熟樹状細胞となる。従って、ガンの治療プロセスとしてはガン患者本人から CD34 陽性細胞を採取して増幅し、必要に応じて未熟樹状細胞に分化させてガン抗原を取り込ませて提示させ、患者体内に戻すことが考えられる。このプロセスの中で、CD34 陽性細胞の増幅に関しては、現状では不十分な成果しか挙げられていない。既往の方法としては、Flt3 リガンド(FL)、幹細胞因子(SCF)、スロンボポエチン(TPO)、インターロイキン 6 (IL-6)、IL-3 を組み合わせて添加した培地中での CD34 陽性細胞の増幅が報告されているが、数ヶ月程度が細胞増殖・未分化維持の限度であり、未分化維持増殖はある程度達成できても、同時に分化も生じてしまうことが問題点である。従って、天然の受容体とそのリガンドを添加することでの樹状前駆細胞の増幅には限界があると考えられる。

そこで、本研究では樹状前駆細胞においてサイトカインや増殖因子とは全く異なる抗原に応答して増殖シグナルを伝達する人工受容体を発現させ、その発現量をコントロールすることで、分化を抑えて未分化維持増殖だけを特異的に長期間達成できるシステムを構築することを目標とした。

2. 研究の進捗状況

これまでに、造血前駆細胞での増幅効果が見られている c-mpl または c-kit の細胞外ドメインを抗フルオレセイン(FL)抗体の ScFv で置換したキメラ受容体(ScFv-c-mpl または ScFv-c-kit)が、培養細胞株 Ba/F3 細胞において、抗原である FL 標識 BSA(BSA-FL) 依存的な増殖シグナルを伝達することを示した。

本年度はこれらのキメラ受容体について、マウス骨髄から取得した造血幹細胞での増幅効果を検証した。まず、ScFv-c-mpl または ScFv-c-kit 発現レトロウィルスベクターをマウス造血幹細胞に導入し、遺伝子導入細胞を、SCF のみ、TPO のみ、SCF + TPO、TPO+BSA-FL、および SCF + BSA-FL 存在下で 5 日間培養し、各条件下で増幅された細胞数と EGFP 陽性率を比べた。その結果、ScFv-c-kit 導入造血幹細胞ではキメラ受容体による顕著な増殖は見られなかったが、ScFv-c-mpl 導入造血幹細胞では、SCF + BSA-FL を加えた場合の細胞数が SCF のみの場合の 4 倍以上に増加し、EGFP 陽性細胞率も増加した。さらに、ScFv-c-mpl 導入造血幹細胞について、増幅された細胞が造血幹細胞の機能を保っているかどうかを調べるために、SCF のみ、SCF + TPO および SCF + BSA-FL の条件下で増幅した細胞をドナー細胞とし、競合細胞と同時に放射線処理したマウスに移植して骨髄再構築能評価を行った。移植後 20 週まで 4 週間ごとに採血し、移植細胞におけるドナー細胞の割合を調べた結果、SCF + BSA-FL で増殖誘導したドナーの造血

幹細胞は SCF のみの場合より高い割合でマウスの生体内に存在した。

以上より、ScFv-c-mpl キメラ受容体を用いて遺伝子導入造血幹細胞を選択的に増幅することに成功した。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

理由：造血前駆細胞で増殖シグナルを伝達する c-mpl、c-kit を用いたキメラ受容体をすでに構築し、血球細胞株で機能的であることが分かった。また造血幹細胞でも増幅効果にはまだ改善の余地があるものの、ScFv-c-mpl キメラ受容体が機能的であることが示された。

4. 今後の研究の推進方策

キメラ受容体の増殖シグナル伝達が弱すぎるものが想定されるので、より強いシグナルが出せるように分子デザインを再考する。具体的には、サイトカイン受容体においては細胞内ドメインの C 末端部分はシグナルの負の制御領域と考えられているので、その部分を削除したキメラ受容体や、膜貫通ドメインの相互作用を高める変異受容体、膜貫通ドメインから細胞内ドメインに続くヘリックス領域の間にアラニン残基を導入して受容体分子の角度を回転させ、コンフォメーションを変化させた受容体を作製する。

また、造血前駆細胞の増殖には、c-mpl、c-kit の他に gp130 も知られていることから、これらの 3 種類のキメラ受容体を共発現させることで、より効率よい増幅ができるかどうかを検討する。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- ・ Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H. and Nagamune, T. "T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera." *Cytokine* **46**, 127-136, 2009. (査読有)
- ・ Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H. and Nagamune, T. "The influence of domain structures on the signal transduction of chimeric receptors derived from the erythropoietin receptor." *J. Biochem.* doi: 10.1093/jb/mvp013, 2009. (査読有)
- ・ Tanaka, K., Kawahara, M., Ueda, H. and Nagamune, T. "Selection and growth regulation of genetically modified cells with hapten-specific antibody/receptor tyrosine kinase chimera." *Biotechnol. Prog.*, in press. (査読有)
- ・ Sogo, T., Kawahara, M., Tsumoto, K., Kumagai, I., Ueda, H. and Nagamune, T. "Selective expansion of genetically modified T cells using an antibody/interleukin-2

receptor chimera." *J. Immunol. Methods* **337**, 16-23, 2008. (査読有)

- ・ Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H. and Nagamune, T. "Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency." *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 975-984, 2008. (査読有)

他 7 件

〔学会発表〕(計 16 件)

国際

- ・ Masahiro Kawahara, Yusuke Shimo, Azusa Hitomi, Takahiro Sogo, Hiroshi Ueda and Teruyuki Nagamune "Antigen-dependent migration of mammalian cells via an antibody/receptor chimera", The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community, 2008-11-30, 芝浦工業大学豊洲キャンパス
- ・ Wenhai Liu, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune "THE CHARACTERISTIC OF CHIMERIC RECEPTORS BASED ON ERYTHROPOIETIN RECEPTOR", The 21st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2008), 2008-11-26, Fukuoka, Japan

国内

- ・ 十河孝浩、河原正浩、上田 宏、長棟輝行 「キメラ IL-2 レセプター導入による遺伝子導入 T 細胞の選択的増幅法の開発」第 59 回日本生物工学会(2007)、2007 年 9 月 25 日、広島大学東広島キャンパス
- ・ 陳 建宏、河原正浩、上田 宏、長棟輝行 「人工染色体を用いたキメラ受容体による造血幹細胞の増殖制御」第 59 回日本生物工学会(2007)、2007 年 9 月 26 日、広島大学東広島キャンパス

他 12 件

〔図書〕(計 4 件)

- ・ Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., and Nagamune, T. " Selective expansion of genetically modified T cells using a chimeric IL-2 receptor for cancer therapy." *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Ikura, K. et al., Ed.), 15., Springer, 9-15, in press.

他 3 件

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/nagamune/index.html>