

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360337

研究課題名(和文)キメラ受容体を用いたヒトiPS細胞の未分化維持・増幅と分化技術の開発

研究課題名(英文)Development of technologies for maintaining undifferentiated state and inducing growth and differentiation of human iPS cell by using chimeric receptor

研究代表者

長棟 輝行(Nagamune, Teruyuki)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20124373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療の実現には、目的の分化細胞を効率的かつ安価に大量調製する技術が求められるが、細胞の分化誘導因子として用いられるサイトカインには高価なものが多い。そこで本研究では、サイトカイン受容体の細胞外ドメインを一本鎖抗体に置換したキメラ受容体を構築して細胞膜上に発現させ、高価なサイトカインとは全く異なる安価な抗原の添加によって、幹細胞の未分化維持・増幅や特異的な細胞系譜への分化誘導を実現する系の構築を行った。

研究成果の概要(英文)：To realize regenerative medicine, a technology to efficiently prepare a large number of differentiated cells of interest at low cost is necessary. However, differentiation-inducing factors such as cytokines are generally expensive. In this study, we designed chimeric receptors, in which the extracellular domain of cytokine receptors is replaced by single-chain antibody, which enables signaling in response to a cheap antigen instead of expensive cytokines. We aimed to develop a system to keep and expand stem cells in an undifferentiated state, and to differentiate them into specific lineages by expressing the cheap antigen-responsive chimeric receptors on the cell surface.

研究分野：細胞工学、蛋白質工学

キーワード：サイトカイン受容体 キメラ蛋白質 シグナル伝達 未分化維持技術 増殖・分化技術

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞は、ES 細胞のように胚を破壊することなく、簡便に得ることのできる皮膚細胞のような体細胞から作製可能であることから、倫理的にも理想的な再生医療の細胞ソースとして世界的に注目を浴びている。また、HLA タイプの異なる数十種類程度のヒト iPS 細胞を作製してバンク化すれば、ほとんどの日本人において拒絶反応のない細胞移植が可能になるため、腫瘍原性などの安全性の問題をクリアすれば一躍実用化が進むと思われる。創薬の観点からは、特定の疾患患者の体細胞由来の iPS 細胞から分化誘導した疾患モデル細胞が、創薬研究のための細胞ソースとして注目を浴びている。また、薬剤候補の毒性試験で問題が出やすい心筋細胞、肝細胞、神経細胞を正常ヒト iPS 細胞から誘導して利用することで、ヒト細胞レベルで毒性を有する薬剤を創薬スクリーニングの過程で排除でき、動物実験やヒト臨床試験に係るコストと時間を大いに節約することが可能となる。さらに、HLA タイプの異なるヒト iPS 細胞株を用いることで、様々な遺伝的バックグラウンドを持った個人に対する薬効や安全性を予測することができ、テーラーメイド医療への応用が期待されている。

ヒト iPS 細胞を再生医療、創薬分野へ応用する際に開発すべき共通技術として、ヒト iPS 細胞やそれから作製した組織幹細胞の維持・増幅技術、② iPS 細胞や組織幹細胞から治療または創薬に必要な系譜細胞を低コストかつ高効率に大量調製する技術が挙げられる。最近、ヒト iPS 細胞から分化誘導された心筋細胞やドーパミン作動性神経細胞が Repro CELL 社、Cellular Dynamics 社などから研究用細胞として市販され始めた。しかし、その分化誘導過程で高価なサイトカインや増殖因子が必要であり、また、目的の細胞への分化誘導効率が低いため、分化誘導された細胞の価格が  $10^6$  cells/バイアルで 30~40 万円と、ヒト初代培養細胞の価格 10~20 万円の約 2 倍の価格になっている。また、iPS 細胞から分化させた組織幹細胞を維持・増幅できれば、目的の系譜の分化細胞を得る時間を大幅に短縮できると考えられるが、現状では組織幹細胞の未分化維持自体も達成されていない。このように、均質な状態で組織幹細胞を維持・増幅することや、目的の系譜以

外の細胞を作ることなく、低コストに、効率良く目的の系譜の細胞だけを大量に分化誘導する技術は未だ実現されていない。

## 2. 研究の目的

前項で述べたように、再生医療の実現には、目的の細胞に分化した細胞を効率的かつ安価に大量調製する技術が求められるが、細胞の分化誘導因子として用いられるサイトカインには高価なものが多い。そこで本研究では、サイトカイン受容体の細胞外ドメインを一本鎖抗体(scFv)に置換したキメラ受容体を構築して細胞膜上に発現させ、高価なサイトカインとは全く異なる安価な抗原の添加によって、幹細胞の効率的な未分化維持・増幅や特異的な細胞系譜への分化誘導を実現するシステムの構築を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1)キメラ受容体による分化誘導効果の検証

ヒト肝がん細胞株 HepG2 は、インスリン刺激によりグルコース取り込み能が上昇する。またマウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 は、インスリン刺激により脂肪分化が進行して脂肪滴を形成する。そこで、抗フルオレセイン scFv をインスリン受容体細胞内ドメインと連結したキメラ受容体遺伝子を構築し、HepG2、3T3-L1 細胞へ導入して発現させ、インスリンシグナルを抗原であるフルオレセイン標識 BSA(BSA-FL)によって代替できるかどうかを、それぞれ蛍光標識グルコースの取り込み量の解析、および脂肪滴のオイルレッド O 染色により検証した。

さらに、別の分化系として、マクロファージ様細胞株 RAW264 を用いた実験を行った。RAW264 は RANKL(NF- $\kappa$ B 活性化受容体リガンド)の刺激により破骨細胞へと分化する。そこで RANKL の受容体である RANK の細胞内ドメインを用いたキメラ受容体遺伝子を構築し、RAW264 へ導入して発現させて、抗原の添加により破骨細胞への分化誘導を行えるかどうか検証した。

### (2)キメラ受容体による未分化維持増殖の検証

マウスインターロイキン-3(IL-3)依存性

造血前駆細胞株である 32Dcl3 細胞は、種々のサイトカイン刺激により増殖・分化が制御されることが知られている。そこで、抗フルオレセイン scFv とマクロファージコロニー刺激因子受容体 (c-fms)、エリスロポエチン受容体 (EpoR)、またはトロンボポエチン受容体 (c-mpl) の細胞内ドメインとを連結したキメラ受容体遺伝子を構築し、32Dcl3 細胞に導入して発現させ、IL-3 非存在下で抗原である BSA-FL を添加して受容体のオリゴマー化を誘導し、増殖を誘導できるかどうかを検証した。

また、32Dcl3 細胞は顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) により顆粒球に分化することが知られている。そこで、キメラ受容体を抗原刺激することによって増殖を誘導された細胞が、分化ポテンシャルを保持しているかを検証することにした。具体的には、増殖した細胞の培養液から抗原を取り除き、G-CSF を添加した培地で培養後、顆粒球分化マーカーである CD11b の細胞表面発現をフローサイトメトリーで検出した。

### (3) ES 細胞から造血前駆細胞への分化誘導を促進するキメラ受容体の探索

ES 細胞から目的系譜への分化誘導を効率化することは再生医療の実現に重要である。そこで、種々のキメラ受容体を構築して ES 細胞で発現させ、造血前駆細胞への分化誘導を促進する受容体を探索した。細胞内ドメインとしてタイプ I サイトカイン受容体 4 種類 (エリスロポエチン受容体 (EpoR), トロンボポエチン受容体 (c-mpl), インターロイキン 2 受容体 (IL-2R), IL-6 受容体シグナル伝達サブユニット (gp130)) または受容体型チロシンキナーゼ 4 種類 (マクロファージコロニー刺激因子受容体 (c-fms), 上皮成長因子受容体 (EGFR), インシュリン受容体 (IR), 幹細胞因子受容体 (c-kit)) を持つキメラ受容体を構築した。

マウス ES 細胞から胚様体を形成させることで自発的な分化を誘導すると、胚様体形成後 6 日目において、造血系前駆細胞分画である CD41 陽性細胞が出現することが知られている。そこで、各種キメラ受容体を単独あるいは複数の組み合わせで ES 細胞に発現させ、特異的抗原として BSA-FL を加えて胚様体形成を行い、6 日目において CD41 陽性細胞分画

の出現頻度をフローサイトメトリーで測定し、その結果を指標として、ES 細胞から造血前駆細胞への分化に適した受容体シグナルの探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) キメラ受容体による分化誘導効果の検証

HepG2 細胞、3T3-L1 細胞に scFv-インスリン受容体キメラを安定発現させた株を樹立し、実験を行った結果、抗原非依存的ではあったものの、キメラ受容体導入 HepG2 ではグルコース取り込み能の有意な促進 (図 1)、およびキメラ受容体導入 3T3-L1 では脂肪成分の蓄積 (図 2) が見られた。

また、RAW264 細胞に scFv-RANK キメラを安定発現させた株も作製して実験を行った結果、抗原なしの場合でも破骨細胞の形成は見られたものの、抗原刺激により破骨細胞に分化する細胞数が有意に増加した (図 3)。また、このときの分化効率には RANKL の刺激とほぼ同等であった。以上より、本手法により分化シグナルを代替できることが示された。

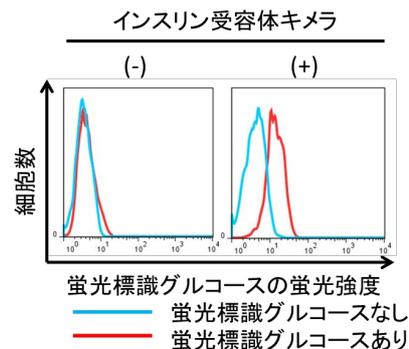


図 1 HepG2 細胞におけるグルコース取り込みアッセイの結果 (抗原非添加)

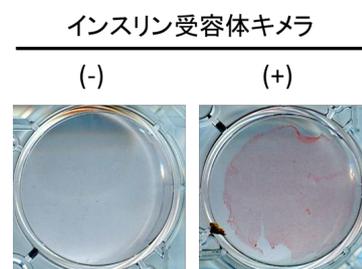


図 2 3T3-L1 細胞における脂肪滴の検出結果 (抗原非添加)

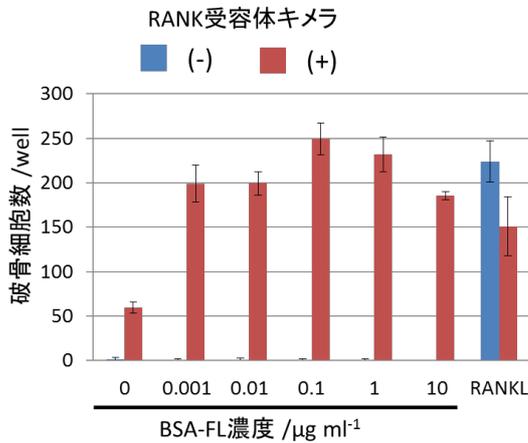


図3 RAW264細胞における破骨細胞分化アッセイの結果

(2)キメラ受容体による未分化維持増殖の検証

32Dcl3細胞に各 scFv-受容体キメラを安定発現させた株を樹立し、実験を行った結果、いずれのキメラ受容体導入 32Dcl3細胞においても、抗原依存的な増殖促進効果が見られた(図4)。また、これらの細胞を抗原存在下で培養後、G-CSFで分化誘導した結果、分化マーカーの陽性率には差はあったものの、いずれのキメラ受容体シグナルで増殖させた細胞もG-CSF添加により顆粒球分化が促進されていることが分かった(図5)。以上より、本手法により造血前駆細胞の増殖シグナルを代替できる可能性が示唆された。

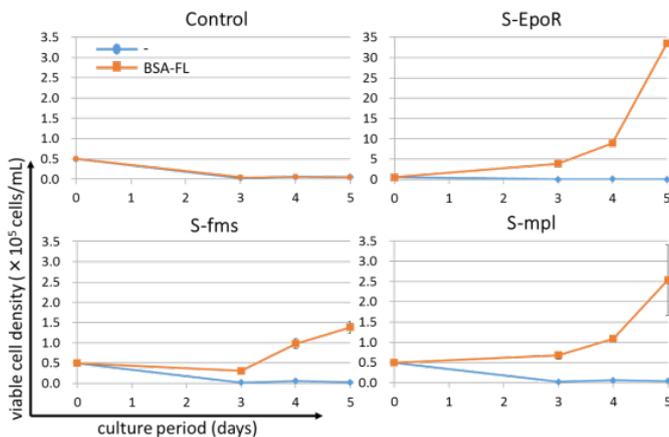


図4 32Dcl3細胞における増殖アッセイの結果

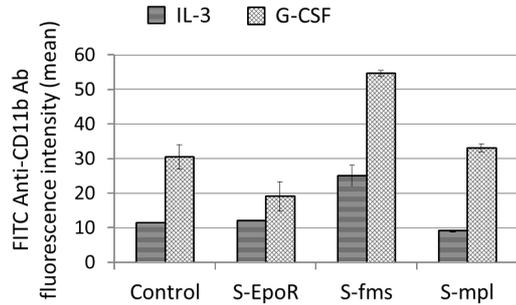


図5 32Dcl3細胞における分化誘導アッセイの結果( IL-3での培養は未分化維持の陰性対照)

(3) ES細胞から造血前駆細胞への分化誘導を促進するキメラ受容体の探索

マウス ES細胞に、構築した受容体を単独あるいは複数導入した一連の細胞株を樹立して解析を行った結果、複数の受容体の組み合わせにおいて、CD41陽性細胞率がネガティブコントロールと比べて上昇する傾向が見られた(図6)。これらの組み合わせは共通して、タイプIサイトカイン受容体1種と受容体型チロシンキナーゼ2種の組み合わせであった。このことから、受容体型チロシンキナーゼとタイプIサイトカイン受容体シグナルのクロストークが血球系系譜への初期分化に重要であることが示唆された。

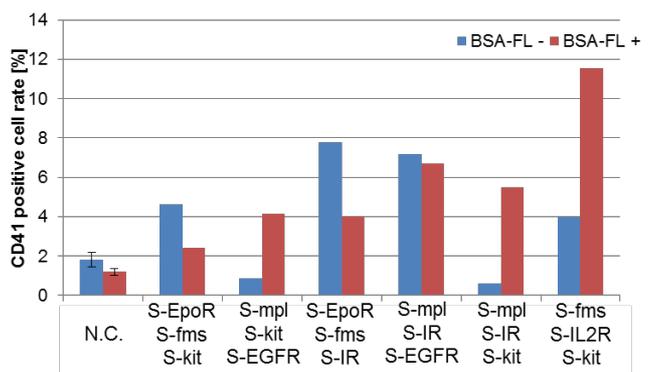


図6 ES細胞から造血前駆細胞への分化誘導を促進するキメラ受容体の探索の結果

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Yamahira, S., Yamaguchi, S., Kawahara, M., Nagamune, T. "Collagen surfaces modified with photo-cleavable polyethylene glycol-lipid support versatile single-cell arrays of both non-adherent and adherent cells." *Macromol. Biosci.* **14**, 1670–1676, 2014, doi: 10.1002/mabi.201400312. (査読あり)
2. Kawahara, M., Hitomi, A., Nagamune, T. "Antigen-responsive regulation of cell motility and migration via the signalobodies based on c-Fms and c-Mpl." *Biotechnol. Prog.* **30**, 411–417, 2014, doi: 10.1002/btpr.1861. (査読あり)
3. Kawahara, M., Hitomi, A., Nagamune, T. "S-Fms signalobody enhances myeloid cell growth and migration." *Biotechnol. J.* **9**, 954–961, 2014, doi: 10.1002/biot.201300346. (査読あり)
4. Tone, Y., Kawahara, M., Hayashi, J., Nagamune, T. "Cell fate conversion by conditionally switching the signal-transducing domain of signalobodies." *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 3219–3226, 2013, doi: 10.1002/bit.24985. (査読あり)
5. Nakabayashi, H., Kawahara, M., Tanaka, K., Nagamune, T. "Construction of antibody/insulin receptor chimera for growth induction of mammalian cells." *Cytotechnology* **65**, 945–953, 2013, doi: 10.1007/s10616-013-9571-5. (査読あり)
6. Tone, Y., Kawahara, M., Kawaguchi, D., Ueda, H., Nagamune, T. "Death signalobody: inducing conditional cell death in response to a specific antigen." *Hum. Gene Ther. Methods* **24**, 141–150, 2013, doi: 10.1089/hgtb.2012.147. (査読あり)
7. Kawahara, M., Nagamune, T. "Engineering of mammalian cell membrane proteins." *Curr. Opin. Chem. Eng.* **1**, 411–417, 2012, doi: 10.1016/j.coche.2012.05.002. (査読あり)
8. Kaneko, E., Kawahara, M., Ueda, H., Nagamune, T. "Growth control of genetically modified cells using an antibody/c-Kit chimera." *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 641–646, 2012, doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.005. (査読あり)

[学会発表](計 13 件)

1. 沈 鐘楚子、中林 秀人、河原 正浩、長棟 輝行 “キメラ受容体を用いた骨髄系前駆細胞株 32Dcl3 の顆粒球分化誘導” 化学工学会第 80 年会, 2015/3/19, 芝浦工業大学(東京都)
2. 山平 真也、山口 哲志、長棟 輝行 “光分解性 PEG 脂質修飾コラーゲン表面を用いた一細胞アレイ作製と定量的イメージサイトメトリー” 細胞アッセイ研究会, 2015/1/13, 東京大学(東京都)
3. 河原 正浩、坂 晃一郎、藤 晋、陳 建宏、大津 真、中内 啓光、長棟 輝行 “造血幹細胞の増幅を指向したキメラ受容体の構築” 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014/9/18, 九州大学(福岡県)
4. 中林 秀人、青山 幸恵子、河原 正浩、長棟 輝行 “抗原応答性キメラ受容体の破骨細胞分化への応用” 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014/9/17, 九州大学(福岡県)
5. 沈 鐘楚子、中林 秀人、河原 正浩、長棟 輝行 “抗原応答性キメラ受容体を用いた骨髄系前駆細胞株の増殖・分化制御” 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014/9/17, 九州大学(福岡県)
6. Teruyuki Nagamune, Masahiro Kawahara “Chimeric receptor engineering to control cell fate and its applications” 2013 AIChE Annual Meeting, 2013/11/5, サンフランシスコ(米国)
7. 中林 秀人、河原 正浩、長棟 輝行 “胚性幹細胞の低コスト分化法開発を志向した抗体/受容体キメラの構築” 第 65 回生物工学会大会, 2013/9/18, 広島国際会議場(広島県)
8. 中林秀人、青山幸恵子、河原正浩、長棟輝行 “抗体/インスリン受容体キメラによる細胞の代謝・分化制御” 第 26 回

日本動物細胞工学会 2013 年度大会 (JAACT2013), 2013/7/18, ホテルフジタ 福井 (福井県)

9. 河原 正浩、戸根 悠一郎、長棟 輝行 “抗体/受容体キメラを用いた増殖から死への細胞運命変換” 第 26 回 日本動物細胞工学会 2013 年度大会 (JAACT2013), 2013/7/18, ホテルフジタ福井 (福井県)
10. 中林 秀人、青山 幸恵子、河原 正浩、長棟 輝行 “抗体/インスリン受容体キメラによるインスリンシグナルの活性化” 化学工学会 第 78 年会、2013/3/17、大阪大学 (大阪府)
11. 河原正浩、戸根悠一郎、上田宏、長棟輝行 “抗原依存的に細胞死シグナルを伝達する抗体/受容体キメラの創製” 第 85 回生化学会大会、2012/12/16、福岡国際会議場 (福岡県)
12. Masahiro Kawahara, Yuichiro Tone, Daichi Kawaguchi, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune “A novel suicide switch utilizing an antigen-antibody system” JAACT2012, 2012/11/28, 名古屋国際会議場 (愛知県)
13. Hideto Nakabayashi, Masahiro Kawahara, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune “Construction of Antibody/insulin Receptor Chimera for Mimicking Insulin Receptor Signaling” JAACT2012, 2012/11/28, 名古屋国際会議場 (愛知県)
14. 戸根 悠一郎、河原正浩、上田 宏、長棟 輝行 “抗体-Fas キメラを用いたがん細胞の細胞死誘導” 第 64 回日本生物工学会大会、2012/10/25、神戸国際会議場 (兵庫県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

#### 6 . 研究組織

##### (1)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

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

河原 正浩 (KAWAHARA, Masahiro)  
東京大学・大学院工学系研究科・講師  
研究者番号：50345097

山口 哲志 (YAMAGUCHI, Satoshi)  
東京大学・先端科学技術研究センター・講師  
研究者番号：80398106