



Title	サイトカインと受容体、その新しいクローニング法に関する研究
Author(s)	小嶋, 哲郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42721
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	小嶋哲郎
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第15816号
学位授与年月日	平成13年1月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	サイトカインと受容体、その新しいクローニング法に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範
	(副査) 教授 八木 清仁 教授 山元 弘 教授 土井 健史

論文内容の要旨

サイトカインは非常に微量でその生理活性が発揮され、細胞膜表面に存在する特異的な受容体と結合することにより細胞内にその作用を伝える。既にいくつかのサイトカインが臨床応用されており、最も効果的な医薬品として受け入れられている。また受容体もサイトカインクローニングのプロープとして利用できるだけでなく、細胞外ドメインからなる可溶性受容体がアンタゴニストとして開発されている。今後もサイトカインと受容体は医薬品の候補としてますます重要なターゲットとなると考えられる。多種類のソースを用いてサイトカインや受容体などの目的の活性を有する分子を単離同定するためには、再現性の高い方法で、なおかつ多検体を同時にスクリーニングできる手法を開発することが重要である。そこで比較的安定した性質を期待できるマウス骨髄細胞を用いた軟寒天中でのコロニー形成法を開発し、さらにサイトカインや受容体が分泌過程を経て発現されることに着目して、これらを含む分子を網羅的に分離できる効率的な方法を考案し、ここにまとめた。

まず前者の方法を用いて種々のヒト癌細胞をスクリーニングし、膵臓癌由来細胞株 HPC-Y5 培養上清中にインターロイキン (IL) -3 単独よりも巨核球コロニー数を増大させる強い巨核球増幅活性 (Meg-POT) を見出した。HPC-Y5 の培養上清 1 トンから Meg-POT 活性を指標に活性本体である 32kDa の新規サイトカイン Megakaryocyte Potentiating Factor (MPF) の精製に成功した。その部分アミノ酸配列情報を元に完全長 MPFcDNA をクローニングすることが出来た。これにより MPF が 622 アミノ酸残基の巨大な前駆体としてコードされていることが明らかになった。さらに CHO 細胞に MPFcDNA を導入して組換え MPF の産生を行なったところ 33kDa と 30kDa の 2 種類の MPF が得られた。これらを解析することにより、少なくとも 2 段階のプロセッシングによる MPF の活性制御の可能性が示された。

ヒトゲノムプロジェクトは 2003 年には完成する予定であり、生物活性を指標にするが故の様々な制約を回避できる、新たな切り口の迅速なスクリーニングが求められた。そこで考えられた戦略の一つがシグナルシーケンスストラップ (SST) である。有望なソースについてサイトカインや受容体などを含む分泌・膜蛋白質をまず分離し、そのうち興味のあるクローンについて詳細に解析しようとの考え方である。このためにはソースが発現する分泌・膜蛋白質を網羅的に分離する必要があるが、従来方法では操作性や酵母を宿主とするため偽陽性・偽陰性出現などの問題があった。一方、膜貫通領域の Ser⁴⁹⁸ を Asn に置換した変異 MPL (トロンボポイエチン受容体) は恒常的活性型受容体として Ba/F3 細胞株に IL-3, TPO 非存在下での自律増殖能を与えることが知られていた。変異箇所が膜貫通領域にあ

り、サイトカイン受容体のシグナル伝達には細胞内領域が関与することから、この場合恒常的活性型変異 MPL 自身の細胞外領域は必須ではなく膜上に移行することが重要であると考えられた。そこで変異 MPL と GM-CSF のキメラ受容体を Ba/F3 に発現させたところやはり自律増殖が可能になり、シグナル配列を除いたものでは増殖できなかった。そこでレトロウイルスとこの恒常的活性型変異 MPL を組み合わせて動物細胞を宿主とした SST (SST-REX) を開発した。パイロット実験では偽陽性クローンはいっさい認められず、1 段階のスクリーニングで非常に効率良く分泌・膜蛋白質を分離できることが示された。本法により分泌・膜蛋白質の cDNA のカタログ化が可能になり、そこから発現パターンなどを元に興味あるクローンを選び詳細な解析を行なう戦略が可能となった。

本法によって得られたクローンのひとつ、TNF 受容体スーパーファミリー (TNFRSF) の新たなメンバー TROY (TNFRSF expressed on the mouse embryo) の解析を行なった。他の TNFRSF メンバーと比較すると、毛包の発達に関与するといわれている Edar が最も TROY に構造的に近く、細胞外ドメインは 33% の一致をみた。また in situ hybridization 解析ではマウス皮膚の毛包で強い発現が確認され、Edar との強い関連が示唆された。さらに TROY の細胞内領域に TRAF 2 の結合配列を見出し、TROY による NF- κ B の活性化誘導を検討したところ、TROY の過剰発現による NF- κ B 活性化誘導が認められ、TRAF 2, 5, 6 の優性抑制変異体によって活性化が抑えられ、TROY からのシグナルが TRAF を介して NF- κ B を活性化することが明らかとなった。またマウス染色体上の *Troy* 遺伝子の位置が皮膚や体毛に異常を呈する変異 *Wc* の近傍であることが明らかとなり、TROY が *Wc* である可能性が示唆された。

これらの手法は、新規サイトカインや受容体の分離同定にとって有用な手説を提供するものであり、今後の新しい医薬品検索において貴重な貢献をすると考えられる。

論文審査の結果の要旨

分子細胞生物学の発展により、サイトカインを初めとする種々リガンド蛋白や抗体蛋白、リセプター蛋白などを医薬品として応用する試みがなされてきている。それらサイトカインあるいは受容体などについて、多種類の材料源を用いて目的の活性を有する標的分子を同定するためには、再現性の高い方法で、かつ多検体を同時にスクリーニング出来る手法を開発することが重要である。著者はこうした観点から、一定の品質で大量に調整可能な、マウス骨髓細胞を用いた軟寒天中でのコロニー形成法を利用して、巨核球コロニー数を増幅する活性を指標に、64 種のヒト癌由来細胞株の培養上清をスクリーニングした。その結果、以下の成果が得られた。

- 1) 脾臓癌由来細胞株 HPC-Y5 培養上清から、32KDa の新規 Meg-POT (Megakaryocyte Potentiator) 活性因子の純化に成功した。著者はこれを MPF (Megakaryocyte Potentiating Factor) と命名した。
- 2) 著者は 1) の過程において、煩雑な活性自体をスクリーニングするという生物活性によらず、分泌・膜蛋白を網羅的にクローニングでき、効率が良く、バックグラウンドが殆どない方法を模索した。その結果、TPO の恒常的活性型変異受容体とレトロウイルスを利用した、新たなシグナル・シーケンス・トラップ法 SST-REX (SST-Retrovirus-Mediator Expression Screening) を開発した。
- 3) SST-REX を用いて、実際に新規 TNF 受容体スーパーファミリーをクローニングし、TROY と命名した。
- 4) さらに本受容体のシグナルに TRAF と NF- κ B が介することを証明するとともに、毛包の分化に関与する Edar と非常に高い類似性を有することを明らかにした。また、皮膚と毛に異常を呈する *Wc* マウスの変異部位の近傍に TROY 遺伝子がマップされることを認めた。

本研究は、生物活性によるアッセイシステムから、新規サイトカイン MPF を単離するとともに、新たなシグナル・シーケンス・トラップ法 SST-REX を開発し、TROY を見出した。今後この新たな方法を用いて有用因子のクローニングがなされ、ポストゲノム研究に多大な貢献を果たすものと思われ、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものとする。