

## 特集【ここまで来た再生医療】

## 細胞死抑制活性強化因子を用いた蛋白質治療法の開発

太田 成男

日本医科大学院加齢科学系専攻細胞生物学分野

## Development of the Protein Therapeutics Using the Super Anti-cell Death Factor FNK

Shigeo Ohta

Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences,  
Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

## Abstract

A powerful artificial anti-apoptotic factor will be useful for the reproductive therapies for many diseases by prolonging survival of stem cells. For constructing it, we designed the super anti-apoptotic factor by disturbing three intramolecular polar interactions among  $\alpha$ -helix structures of Bcl-x<sub>L</sub>. The resultant mutant Bcl-x<sub>L</sub>, named FNK, was expected to make the pore-forming domain more mobile and flexible than the wild-type. When overexpressed in Jurkat cells, FNK was markedly more potent in prolonging survival following apoptosis-inducing treatment with a kind of cell death cytokines (anti-Fas) a protein kinase inhibitor (staurosporine) cell cycle inhibitors (TN-16, camptothecin, hydroxyurea and trichostatin A) or oxidative stress (hydrogen peroxide and paraquat) than wild-type Bcl-x<sub>L</sub>. Furthermore, the transfectants of FNK became more resistant against a calcium ionophore and even a heat treatment than wild-type Bcl-x<sub>L</sub>. In addition, FNK showed marked anti-apoptotic activity in CHO and Jurkat cells deprived of serum. Thus, FNK may be the first mutant generated by site-directed mutagenesis of Bcl-x<sub>L</sub> with an enhance gain-of-function phenotype.

Next, we tried to transduce the FNK protein into cells. Protein therapeutics has the advantage of delivering proteins in a short period of time. We have engineered the anti-apoptotic *bcl-x* gene to generate the super anti-apoptotic factor, FNK, with a more powerful cytoprotective activity. In this study, we fused the protein transduction domain (PTD) of the HIV/Tat protein to FNK, and used the construct in an animal model of ischemic brain injury. When added into culture media of human neuroblastoma cells and rat neocortical neurons, PTD-FNK rapidly transduced into cells and localized to mitochondria within 1 hr. It protected the neuroblastomas and neurons against staurosporine-induced apoptosis and glutamate-induced excitotoxicity, respectively. The cytoprotective activity of PTD-FNK was found at concentrations as low as 0.3 pM. Additionally, PTD-FNK affected the cytosolic movement of calcium ions, which may relate to its neuroprotective action. Immunohistochemical analysis revealed that myc-tagged PTD-FNK (PTD-myc-FNK) injected intraperitoneally into mice can have access into brain neurons. When injected intraperitoneally into gerbils, PTD-FNK prevented delayed neuronal death in the hippocampus caused by transient global ischemia. These results suggest that PTD-FNK has a potential for clinical utility as a novel protein therapeutic strategy to prevent cell death in the brain.

Thus, the protein delivery system will be useful to make cells survived for a long time during the differentiation of stem cells in the reproductive therapies .

( J Nippon Med Sch 2003; 70: 442-446 )

Key words: apoptosis, protein transduction, protein therapy, Bcl-2 family, site-directed mutagenesis

## はじめに

再生医療では、分化能をもつ細胞を移植して分化を促すことによって、組織を再生する。その移植時に多くの細胞は環境の変化に対応できず、あるいは細胞性免疫によって多くの細胞は死滅してしまう。そのために、多くの分化能を持つ細胞を必要とし、再生医療の障害になっている。そこで、移植する以前の細胞を耐性化して移植した後の再生の効率を著しく向上させようとするのが、私たちの研究目的である。

私たちが開発しようとしている方法は、細胞死を抑制する蛋白質を細胞の中へ直接導入しようとするものである。蛋白質は高分子であり、一般には細胞膜を通過できない。しかし、最近の研究の進歩によって、蛋白質を細胞内に直接導入することが可能になった。そこで、細胞死を抑制する蛋白質を細胞内に導入して、細胞死を抑制して、効率よく細胞移植しようとするのが私たちの戦略である。まだ動物実験の段階であり、実際の再生医療においての実際の適用までに実験が進んでいないので、原理的に可能であることを示すにとどめる。しかし、原理的には今までの方法とは根本的に異なる新しい方法であり、実用化へ向けて期待のもてる方法であると考えている。

### 1. 蛋白治療開発の目的と意義

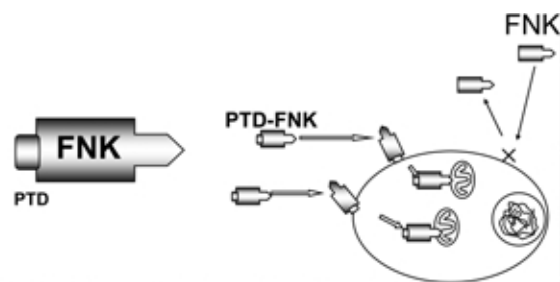
蛋白治療という言葉は、Protein Therapeutics の訳語で最近とみに注目を浴びている概念である。遺伝子治療では導入した遺伝子を十分発現させることが依然として困難であり、本来の遺伝子に変化をおよぼす危険性を伴う。そのためか、遺伝子治療の現在も一般化されていない。一方、遺伝子ではなく、遺伝子産物である蛋白質を直接細胞内へ導入して治療にあたるのが、蛋白治療の概念である。蛋白質は細胞内に導入された場合もすみやかに分解され、副作用は少ないと思われる。

蛋白質は高分子であるので、通常は細胞膜を通過することはできない。しかし、HIV 遺伝子産物の Tat 蛋白の一部の PTD (Protein Transduction Domain) を結合させるとその蛋白質は膜を通過して細胞内へはいりこむことが報告された。さらに、特殊なペプチドと混在させるだけで、細胞内へ入り込むことが報告されている。このような方法によって、蛋白質を細胞内へ導入し治療にあたらうというのが、蛋白治療という新しい戦略である(概念図、図1)。

ここでは、この新しい概念を用いて、細胞死を抑制する蛋白質を細胞内に導入し、再生医療に用いる細胞を耐性化することを目的とする。

### 2. 細胞死を抑制する強化蛋白質の人工的作成

アポトーシスは遺伝子によって制御されている細胞死で、細胞の環境の変化によっても生じる。アポト



### PTD: Protein Transduction Domain

11 amino acid-residues of HIV/Tat protein  
Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg

図1 蛋白治療の概念図

11 アミノ酸で構成される PTD (Protein Transduction Domain) を結合させた蛋白質 PTD-FNK は細胞内に入り込むことができる。そして、PTD-FNK はミトコンドリアまで到達する。一方、PTD を結合していない FNK 蛋白質は細胞内に入り込むことはできない。

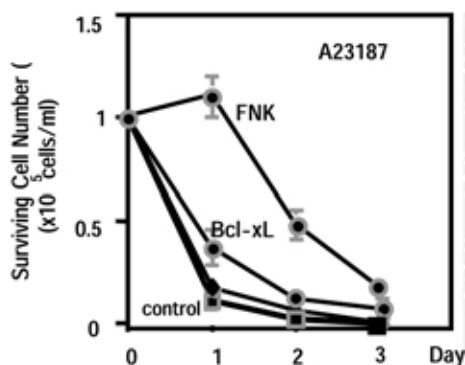


図2 FNK を発現させている Jurcat 細胞の Ca イオンフォア (A 23187) への耐性

A 23187 を添加後、1 日後で、対照細胞はほぼ死滅してしまう。Bcl-x<sub>L</sub> 発現細胞はやや耐性を示すが、FNK 発現細胞に比べると、その効果は少ない。

シスを抑制する因子に Bcl-x<sub>L</sub> がある。私たちは、アポトーシス抑制因子 Bcl-x の高分解能の蛋白立体構造を決定した。その構造によって Bcl-x<sub>L</sub> 分子内を安定に保つための水素結合の存在までも決定することができた。分子内のヘリックス間を安定にするための水素結合は、8 本あり、ミトコンドリア膜へ貫入する部分は 3 本の水素結合で安定化されていた。この 3 本の水素結合は蛋白質を安定化しているものの、Bcl-x<sub>L</sub> がミトコンドリア膜へ貫入するためには阻害的に働くのではないかと思えた。そこで、アポトーシスを抑制するために必要な部位の自由度を大きくすることを考え、そのために上述の水素結合を 3 本消失するようにアミノ酸をデザインした。遺伝子工学で水素結合を形成しているアミノ酸を 3 カ所フェニルアラニン (F)、アスパラギン (N)、リジン (K) に変換した。この人工的蛋白を変化したアミノ酸の省略文字を用いて FNK

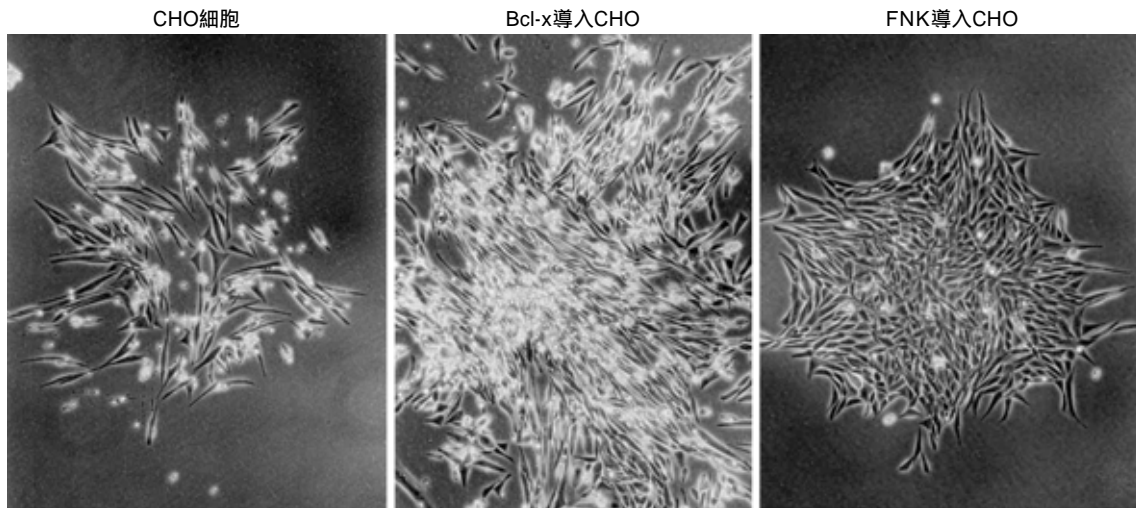


図3 FNK 蛋白質の発現した CHO 細胞  
無血清培地( DMEM/HamF 12 1:1 培地: 増殖因子などは不含)中で培養し, コロニーを形成させた. CHO はコロニーを形成できず, Bcl-x<sub>L</sub> 発現細胞は, コロニーを形成するものの死細胞が多い.

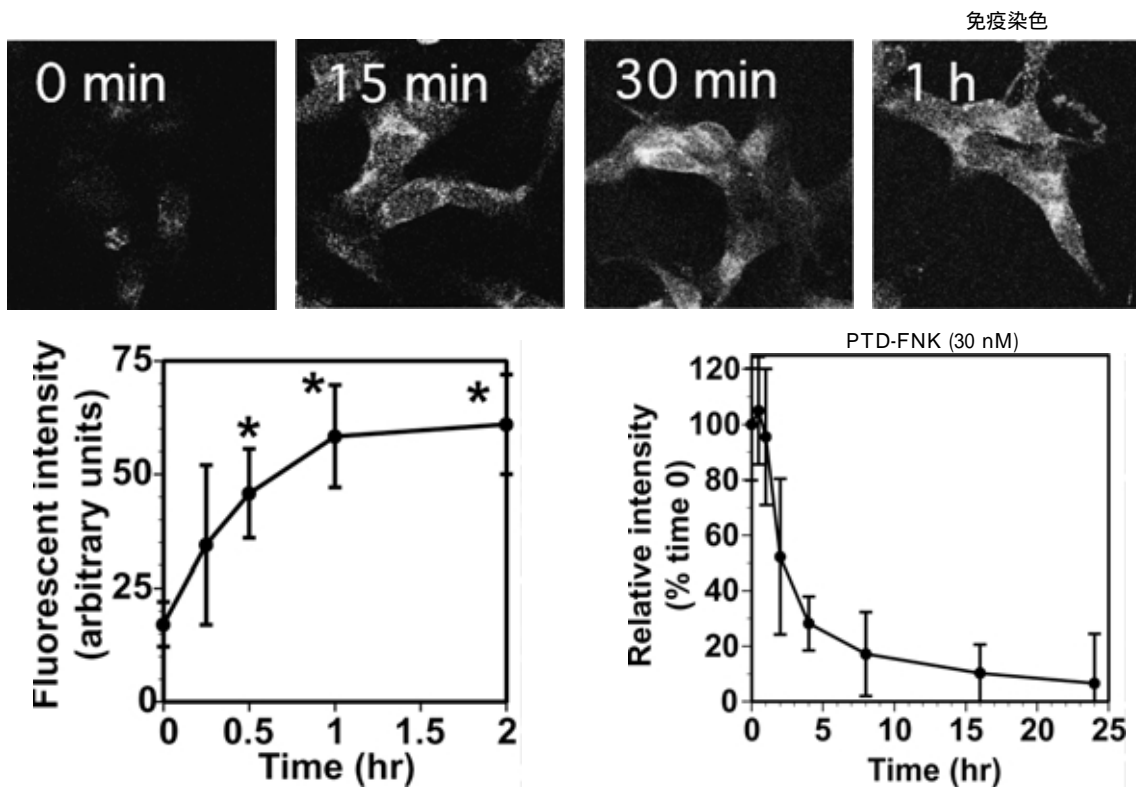


図4 PTD-FNK 蛋白質の培養細胞への導入  
培養神経芽細胞の培養液に PTD-FNK を 30 nM 加えて, PTD-FNK の導入効果を免疫組織法で調べた. 上は, 免疫組織染色, 左は, 細胞内に導入された PTD-FNK の量, 右は, 洗浄後の PTD-FNK の細胞からの消失速度.

と命名した.

この遺伝子を強力なプロモーターの下流に接続し, 培養細胞に導入した. そして, 細胞死を誘導する様々な試薬で処置をした. するとその細胞はアポトーシスを誘導する刺激のみならず, ネクローシスを引き起こ

す刺激に対しても耐性になった. 抗癌剤を含む細胞周期阻害剤, 蛋白質キナーゼ阻害剤, 酸化ストレス, 熱処理, 増殖因子の除去, Fas シグナルの活性化, カルシウムの増強など, 細胞死をおこす試薬や処理に対して耐性になった. 例として, カルシウムイオノフォア

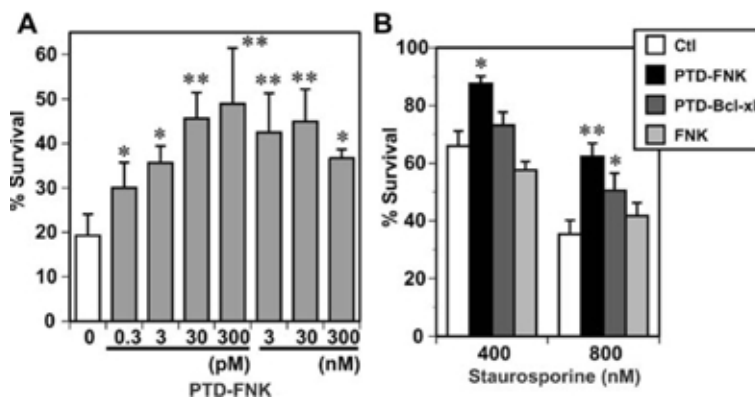


図5 PTD-FNKによるアポトーシス抑制  
培養神経芽細胞に各濃度のPTD-FNKを加え、Staurosporineでアポトーシスを誘導させた。数pMで充分アポトーシスを抑制できる。

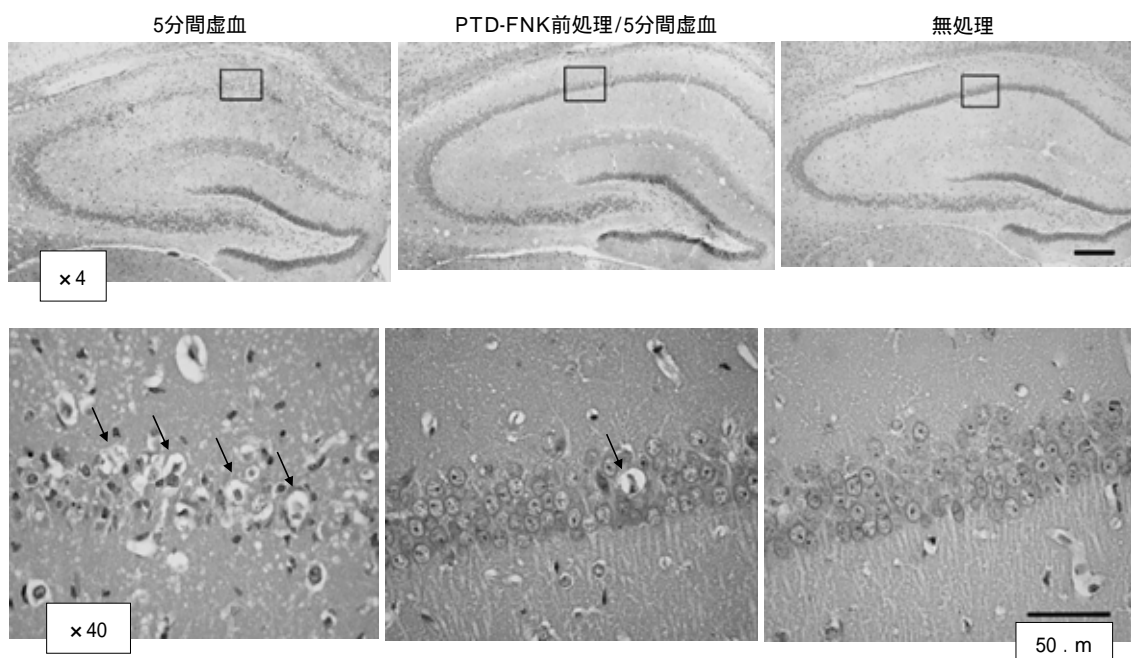


図6 虚血による遅延性神経細胞死の抑制  
PTD-FNKを投与したスナネズミを5分間前脳虚血して、1週間後の脳組織切片を作成した。虚血によりCA1領域の神経細胞はほぼ死滅するが、PTD-FNK投与スナネズミでは、かなりの神経細胞が生存した。

A 23187によって誘導される細胞死の抑制効果を示す。比較として、天然型のBcl-xLでは、細胞死を抑制できないことも示した(図2)。さらに、無血清培地で生育するCHO細胞の写真を示す。天然型のBcl-xLでも、無血清培地で生育するが、細胞死が高頻度に生じている(図3)。このように、細胞死を強力に抑制する人工的強化蛋白を作成することができた。

### 3. 細胞導入型FNK蛋白(PTD-FNK)遺伝子の作成と蛋白精製

次に、PTDをコードする遺伝子部分とFNK遺伝

子を融合させて、PTD-FNK遺伝子を作成した。PTDは11アミノ酸によって構成されるペプチドなので、それに対応するオリゴヌクレオチドを合成した。このPTD-FNK遺伝子をtacプロモーターの下流に接続し、大腸菌に導入して、蛋白質の合成を誘導させ、PTD-FNKを合成した。この蛋白質を大腸菌から抽出して、精製した。

### 4. 培養細胞とスライス培養細胞へのPTD-FNKの導入

まず、PTD-FNKが本当に細胞内へとりこまれて、

細胞死を抑制できるかどうかを調べた。PTD-FNK を細胞培養液に添加すると数 pM のような極めて低濃度でも細胞内へ侵入し、30 分～1 時間程度でミトコンドリアへ到達した (図 4)。そして、ミトコンドリアへ到達した PTD-FNK は細胞死を抑制するようになった (図 5)。PTD 自体には蛋白質をミトコンドリアへ到達する働きはないので、FNK 部分にミトコンドリアへ到達させる機能があると思われる。図 5 に示したように、PTD-FNK はピコモルレベルの極めて低濃度でアポトーシスを抑制した点は特筆すべきである。さらに、初代培養の神経細胞に対し、グルタミン酸で処理した時に生じる細胞死も抑制した。この細胞死はネクローシスと考えられており、そうだとすると PTD-FNK はアポトーシスだけでなく、ネクローシスも抑制できることになり、適用範囲は極めて広くなると予想される。

さらに、軟骨のスライス培養においては、軟骨基質を 0.2 mm 程度まで通過して軟骨細胞へ到達し、細胞死を抑制するのみならず、基質の生産も維持した。

#### 5. モデル実験動物への PTD-FNK の導入

次に、動物へ PTD-FNK を投与した場合に PTD-FNK は各組織へ到達するかどうかを調べた。マウスの腹腔に投与すると、肝、脾臓、小腸、脳の細胞へ到

達することを免疫組織的方法により明らかにした。一般に、投与した異物は、脳血管関門を通過できないが、PTD-FNK は脳血管関門を通過して脳神経細胞へ到達したので、神経細胞の保持にも効果があることが予測された。前脳虚血モデルの砂ネズミに、PTD-FNK を投与して、脳を虚血状態にして、1 週間後に脳の組織標本を作成し、神経細胞の様子を調べると、PTD-FNK 未投与ネズミでは、ほとんどの神経細胞が死滅していたのに対し、PTD-FNK 投与群では、神経細胞が生存していた (図 6)。最近では、局所脳梗塞モデルラットにおいて、虚血後に PTD-FNK を投与して、脳梗塞巣が縮小していることを確認している。

さらに、X 線照射により脾臓の縮小、四塩化炭素やデキサメタゾンにより引き起こされる肝臓の壊死の抑制など、実験動物レベルで、適用範囲を広げている。

#### 6. 最後に

以上のように、PTD-FNK を用いた蛋白質治療の開発状況を記してきた。現実には、人体に PTD-FNK を投与できるかどうかは、まだわからない。特に全身投与の場合は、安全性を確認するという点では、多くの障害があると思われる。一方、移植前の細胞を前処理して移植する方法がより安全で、実現性が高いのではないかと期待している。