

短 報

抗 CD98 抗体依存性細胞融合評価系の構築

鵜飼容子¹⁾, 伊藤守弘²⁾, 大西素子^{1), 3)}¹⁾中部大学応用生物学部, ²⁾中部大学生命健康科学部, ³⁾中部大学生物機能開発研究所

要 旨

ヒトの骨吸収を担う破骨細胞は細胞融合によって多核化した巨大な細胞であり, その過剰な活性化による骨密度の低下は, 骨粗鬆症の一因である. CD98 はヒト T 細胞活性化抗原として見出された重鎖とアミノ酸輸送体である軽鎖からなる膜タンパク質であり, 破骨細胞の細胞融合の制御に関与していることが知られている. 本研究では細胞融合阻害物質の探索を目的として, 抗 CD98 モノクローナル抗体によって細胞融合が誘導されることが知られているヒト単球由来 U2ME-7 細胞を用いた, 細胞融合の直接的測定方法を検討した.

1. はじめに

ヒトの骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の繰り返しによって維持されている. このうち破骨細胞は造血幹細胞に由来する単核の単球/マクロファージ前駆細胞が, 分化過程において細胞融合することによって形成される巨大な多核の細胞である(Boyle et al., 2003, Park et al., 2017). 閉経等による破骨細胞の過剰な活性化は, 骨密度を低下させ, 骨粗鬆症の発症リスクを高めるため, その治療には主に破骨細胞の活性化を抑制する薬剤が使用されているが, 既存の治療薬には服用方法や副作用など問題点も多く, 新規治療薬の開発が望まれている(宮崎・澤田, 2013). 細胞融合によって生じる巨大多核細胞は筋間細胞や破骨細胞など極めて限られた場面でしか見られないため, 破骨細胞分化の細胞融合過程を抑制する化合物は, 破骨細胞特異的に作用する可能性が高いと考えられるが, ほとんど知られていない.

CD98 は糖タンパク質である重鎖(CD98hc)と, 糖鎖を持たない軽鎖からなるヘテロ二量体膜貫通タンパク質であり(Tsurudome and Ito, 2000), このうち CD98hc は細胞融合の制御因子(Fusion regulatory Protein-1(FRP-1))として同定された(Ito et al., 1992). CD98hc は血液細胞の中では単球に選択的に存在し, ヒト末梢血中の単球に CD98hc に対するモノクローナル抗体を作用させると, 24 時間以内に融合細胞

が出現し, 続けて培養すると骨吸収活性を持つ破骨細胞が誘導されることが報告されている(Tabata et al., 1994, Higuchi et al., 1998, Higuchi et al., 1999). 一方, U2ME-7 細胞は, ヒトリンパ腫由来単球様細胞株である CD4 陽性 U937 細胞に, メタロチオネインプロモーター制御下で発現するヒト免疫不全ウイルス由来 gp160 遺伝子を導入した細胞株だが, この抗 CD98hc モノクローナル抗体を加えて培養すると, 同様に細胞融合が誘導され, 多核巨細胞が形成される(Ohta et al., 1994).

そこで本研究では細胞融合を特異的に阻害する化合物探索を目的として, U2ME-7 細胞を用いて抗 CD98hc 抗体による細胞融合の評価系の構築ため検討を行った.

2. 材料と方法

2-1. 試薬類

L(+)-Glutamine, Sodium Hydrogen Carbonate, Cadmium Chloride 2.5-Hydrate, Formaldehyde Solution は富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)から購入した. イーグル最小培地(イーグル MEM)とダルベッコ PBS(-)溶液粉末は日水製薬株式会社(東京)より購入した. ウシ胎児血清(FBS)は Thermo Fisher Scientific K.K(Waltham, USA)より購入した.

HiTrap Protein A Sepharose カラムは GE Healthcare (Chicago, USA) より購入した。8 週齢の BALB/c 雌マウスは日本 SLC 株式会社(浜松, 静岡)より購入した。

2-2. 抗 CD98hc モノクローナル抗体

抗 CD98hc モノクローナル抗体 HBJ127 (Ohgimoto et al., 1995) を産するハイブリドーマ細胞株は伊藤康彦教授(中部大学, 愛知)に供与いただいた。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞を腹腔内に摂取した BALB/c マウスの腹水より、プロテイン A Sepharose アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

2-3. 細胞および細胞培養

U2ME-7 細胞(Koga et al., 1990)は、ウシ胎児血清 5%を含むイーグル最小必須培地で培養した。U2ME-7 細胞はカドミウムを加えると、接着因子としてヒト免疫不全ウイルス由来 gp160 が発現誘導されるため、96 well プレートに 2.0×10^5 cells/well で播種して $10 \mu\text{M}$ となるよう CdCl_2 溶液を加え、 37°C 、5% CO_2 下で培養した。1 時間培養後、抗 CD98hc 抗体を 1 well あたり 25 ng で添加し、さらに培養を続けて融合細胞へ誘導した。培養後、凝集した細胞塊の数および融合細胞数を、拡大倍率 100 倍の顕微鏡下で接眼レンズの視野枠を基準として視野を移動しながら計測した。計測は各条件ごとに 4 well について行い、平均数と標準偏差を算出した。

2-4. 融合細胞の固定と融合細胞数の計測

細胞融合を誘導した U2ME-7 細胞は、マイクロピペッター P200 により穏やかに 10 回ピペッティングを行って、凝集した細胞塊から融合細胞を解離させた。次に 1 well の培養液全量を 48 well プレートに移した後、もとの well に PBS(-)を加えて残った細胞を懸濁し、これを再播種した細胞懸濁液に加えた。この再播種後の well に 25 %となるよう formaldehyde 液を加え、室温にて 3000 rpm で 15 分間遠心分離した後、上清を除去し、蒸留水で 2 回洗浄後、融合細胞数を計測した。計測は各条件ごとに 4 well について行い、平均数と標準偏差を算出した。

3. 結果と考察

3-1. 抗 CD98hc モノクローナル抗体添加後の培養時間による U2ME-7 細胞の接着および融合状態の変化

浮遊細胞である U2ME-7 細胞に抗 CD98hc 抗体を加えて培養すると、まず細胞どうしが接着して塊を形成する。次いでこの凝集塊の中に細胞どうしが融合した多核の巨大な融合細胞が形成される。そこで抗 CD98hc モノクローナル抗体添加後の培養時間による全凝集塊数及び融合細胞を含む凝集塊数の変動を明らかにするために、抗体添加後の培養時間を変えて、凝集塊数の計測を行った。その結果、抗体添加 3 時間後には個々の細胞が互いに接着し、1 well あたり 350 以上の細胞凝集塊が形成され、さらに一部の凝集塊の中に融合細胞の形成が確認できた(図1)。さらに培養時間を増やすと、凝集塊どうしが接着することによって 1 well あたりの凝集塊数は減少したが、培養時間が 18 時間を超えると凝集塊数の減少はほとんど認められなかった。

一部の凝集塊には融合細胞が認められるため、この融合細胞を含む凝集塊の数を計測した結果、抗体添加 3 時間後から増加し、抗体添加後 24 時間で最大に達し、その後 48 時間まで減少しなかった(図1)。このことから、単核の U2ME-7 細胞は抗 CD98hc モノクローナル抗体添加後、18 時間で凝集塊を形成し終えるが、細胞融合は細胞どうしが接着した後起きるため、融合細胞の形成にはより多くの時間を要すると考えられた。

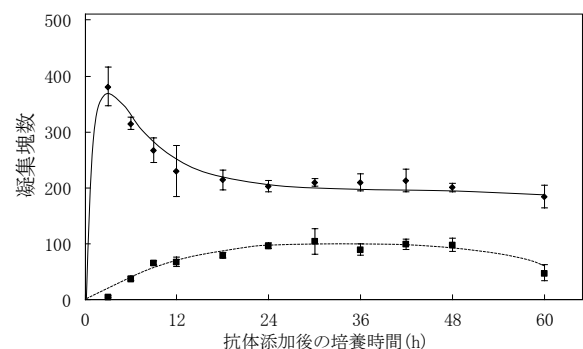


図1 細胞の凝集及び融合状態の培養時間による変化

◆ :凝集塊数

■ :融合細胞を含む凝集塊の数

計測は各培養時間ごとに 4 well について行い、平均数と標準偏差を算出した

3-2. 培養時間による凝集塊の分解への影響とそれによる融合細胞数への影響

1つの細胞凝集塊には複数の融合細胞が形成される可能性がある。融合細胞の数を計測するためには、浮遊細胞である U2ME-7 細胞が接着した細胞凝集塊から融合細胞を解離させる必要がある。そこでピペッティングにより接着した細胞を解離するため、培養時間が細胞の解離に与える影響を検討した。

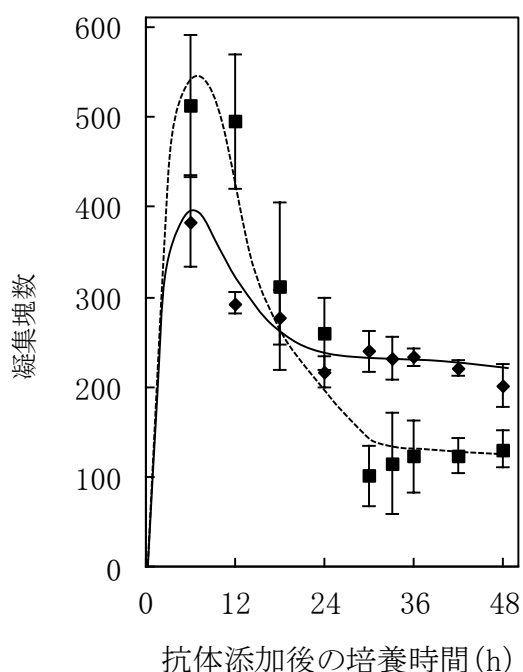


図2 凝集した細胞の分散に対する培養時間の影響

◆ : 分散前の凝集塊数
 ■ : ピペッティングによる分散後の凝集塊数
 計測は 4 well について行い、平均数と標準偏差を算出した。

その結果、抗 CD98hc モノクローナル抗体添加後 12 時間までは、細胞どうしの接着力が強く、凝集した細胞を十分に解離できず、逆に凝集塊の数が増加した(図2)。しかしながら抗体添加後 30 時間では、ピペッティングによって凝集した細胞が分散され、凝集塊の数が最も減少し、これ以降はほとんど変化しなかった。また融合細胞を含む凝集塊の数に比べ、抗体添加後 18 時間に計測された融合細胞数は大きく上昇し(図3)、33 時間で最も多くの融合細胞が計測された(未発表データ)。これは接着していた細胞が分散することによって、凝集塊内部に形成されていた融合細胞が現れて、抗体により生じた融

合細胞の数をより正確に計測可能となったためであると考えられた。以上より、抗体添加後 30 時間から 36 時間の間にピペッティングによって細胞の凝集を分散させて、融合細胞数を計測することにより、抗 CD98hc モノクローナル抗体により誘導される細胞融合のレベルを評価できると考えられる。

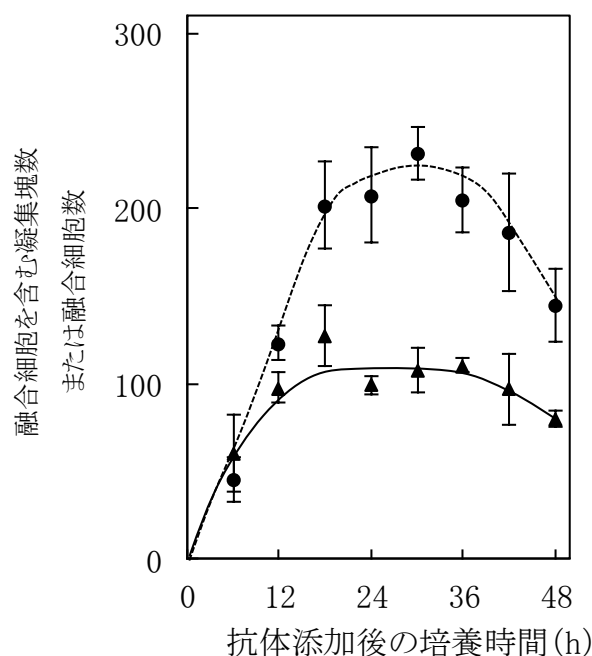


図3 融合細胞の解離に対する培養時間の影響

▲ : 融合細胞を含む凝集塊数
 ● : 凝集分散後の融合細胞数
 計測は 4 well について行い、平均数と標準偏差を算出した。

4. おわりに

本研究では抗 CD98hc モノクローナル抗体によって誘導される細胞融合評価系を構築するため、細胞の回収時間および多核細胞の回収方法の最適化を行った。今後、本評価系により全化合物を対象とした、細胞融合の特異的阻害物質の探索が期待される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、実験材料を提供していただくとともに、有益な助言を戴いた中部大学教授伊藤康彦先生に深く御礼申し上げます。本研究の一部は、中部大学生物機能開発研究所研究費および公益財団法人大幸財団の助成によって行った。

引用文献

- Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. May 15;423(6937):337-42.
- Higuchi S., Tabata N., Tajima M., Ito M., Tsurudome M., Sudo A., Uchida A. and Ito Y. (1998). Induction of human osteoclast-like cells by treatment of blood monocytes with anti-fusion regulatory protein-1/CD98 monoclonal antibodies. *J Bone Miner Res*. Jan;13(1):44-9.
- Higuchi, Y., Ito, M., Nishio, M., Higuchi, S., Tajima, M., Miyamoto, N., Tsurudome, M., Takahiro, S., Uchida, A., and Ito, Y. (1999). Gene expression during osteoclast-like cell formation induced by antifusion regulatory protein-1/CD98/4F2 monoclonal antibodies (MAbs): c-src is selectively induced by anti-FRP-1 MAb. *Bone*. Jul;25(1):17-24.
- Ito, Y., Komada, H., Kusagawa, S., Tsurudome, M., Matsumura, H., Kawano, M., Ohta, H. and Nishio, M. (1992). Fusion regulation proteins on the cell surface: isolation and characterization of monoclonal antibodies which enhance giant polykaryocyte formation in Newcastle disease virus-infected cell lines of human origin. *J Virol*. Oct;66(10):5999-6007.
- Koga, Y., Sasaki, M., Yoshida, H., Wigzell, H., Kimura, G. and Nomoto, K. (1990). Cytopathic effect determined by the amount of CD4 molecules in human cell lines expressing envelope glycoprotein of HIV. *J Immunol*. Jan 1;144(1):94-102.
- 宮崎剛・澤田 泰宏(2013)骨粗鬆症研究と治療法の進歩, 日老医誌 12:130-134.
- Ohgimoto, S., Tabata, N., Suga, S., Nishio, M., Ohta, H., Tsurudome, M., Komada, H., Kawano, M., Watanabe, N. and Ito, Y. (1995). Molecular characterization of fusion regulatory protein-1 (FRP-1) that induces multinucleated giant cell formation of monocytes and HIV gp160-mediated cell fusion : FRP-1 and 4F2/CD98 are identical molecules. *J Immunol*. Oct 1;155(7):3585-92.
- Ohta, H., Tsurudome, M., Matsumura, H., Koga, Y., Morikawa, S., Kawano, M., Kusagawa, S., Komada, H., Nishio, M. and Ito, Y. (1994). Molecular and biological characterization of fusion regulatory proteins (FRPs): anti-FRP mAbs induced HIV-mediated cell fusion via an integrin system. *EMBO J*. May 1;13(9):2044-55.
- Park, J. H., Lee, N. K. and Lee, S. Y. (2017). Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells*. Oct 31; 40(10): 706–713.
- Tabata, N., Ito, M., Shimokata, K., Suga, S., Ohgimoto, S., Tsurudome, M., Kawano, M., Matsumura, H., Komada, H., Nishio, M. and Ito, Y. (1994). Expression of fusion regulatory proteins (FRPs) on human peripheral blood monocytes. Induction of homotypic cell aggregation and formation of multinucleated giant cells by anti-FRP-1 monoclonal antibodies. *J Immunol*. Oct 1;153(7):3256-66.
- Tsurudome, M. and Ito, Y. (2000). Function of fusion regulatory proteins (FRPs) in immune cells and virus-infected cells. *Crit Rev Immunol*.;20(3):167-96.

Title : Evaluation of cell fusion induced by anti-CD98 heavy chain monoclonal antibody.

Authors : Yoko Ukai¹⁾, Morihiro Itoh²⁾, Motoko Ohnishi^{1),3)}

Addresses : ¹⁾ College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

²⁾ College of Life and Health Sciences

³⁾ Research Institute for Biological Functions, Chubu University.

Keywords : Osteoclast, Cell fusion, Syncytium