

広大科研
19
16592089
0100453997

HVJ-エンベロープを用いた歯周病ワクチンの開発

16592089

平成16年度～18年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 鶴田圭伊子

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手)

広島大学図書

0100453997



は し が き

研究組織

研究代表者： 鶴田 圭伊子（広島大学大学院医歯薬学総合研究科助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2, 100	0	2, 100
平成17年度	800	0	800
平成18年度	600	0	600
総計	3, 500	0	3, 500

研究発表

(1) 口頭発表

IL-15/NKG2D/MICA intranet for the bilateral regulation of mucosal inflammation in TCR $\alpha^{-/-}$ mice: Tsuruda K, Kirito M, Matsumoto K, Sasaki K, Ohta N, Iijima H, Hiroi T, Kiyono H and Takahashi I. 12th International Congress of Mucosal immunology (Boston, USA), 2005.

(2) ポスター発表

粘膜上皮由来 IL-15 のマウス腸炎における病態生理学的作用: 鶴田圭伊子, 太田典之, 飯島英樹, 廣井降親, 清野 宏, 桐戸真美, 松元歌奈子, 佐々木一喜, 高橋一郎. 第34回日本免疫学会総会・学術集会(札幌) 2004.

Constitutive expression of MICA ameliorates mucosal inflammation in TCR $\alpha^{-/-}$ mice: Tsuruda K, Koh M, Ohta N, Iijima H, Hiroi T, Kiyono H and Takahashi I. 第35回日本免疫学会総会・学術集会(横浜) 2005.



目次

緒言	3
第1章 マウス TFF3 遺伝子挿入タンパク発現ベクターの構築	
材料および方法	5
結果	10
考察	12
第2章 哺乳動物細胞ならびにマウスへの TFF3 遺伝子の導入	
材料および方法	14
結果	16
考察	24
総括	28
文献	29

【緒 言】

消化管などの粘膜は上皮細胞の単層により覆われている。消化管粘膜は、体の内と外を隔てる物理的障壁となるのみならず、上皮層に散在する粘液産生細胞（杯細胞）より分泌されたムチンを主体とする粘液層の形成や抗菌ペプチドの分泌を介して個体防御において積極的な役割を果たしている。この粘液層は、また、上皮を機械的な障害作用から保護し、細菌の上皮への到達を阻止する働きを担っている。さらに、粘液中には上皮細胞の修復を促す因子（消化管トレフォイルファクター）も存在しており、粘膜の損傷治癒に対しても貢献していることが明らかになりつつある。

トレフォイルファクターファミリー（trefoil factor family:TFF）ドメインペプチドは粘液産生細胞（杯細胞）の分化、増殖に関わる物質として明らかにされてきたが、近年、消化管上皮の損傷治癒への効果が注目されている。トレフォイルファクターファミリーには、TFF1、TFF2 および TFF3 と呼ばれる3種類が存在する。これらのペプチドのアミノ酸配列中には共通した6個のシステイン残基が存在し、3カ所でS-S結合して“三つ葉型”様の構造をとることからトレフォイル（クローバーなどの三つ葉植物）ファクターと名付けられた。トレフォイルファクターファミリーの正常組織での発現部位は、TFF1が胃底腺のmuck neck cell、TFF2が胃幽門部の粘液産生細胞、そしてTFF3が小腸、大腸の杯細胞である。

TFF ペプチドは消化管粘膜の保護、創傷治癒や組織修復に重要な役割を演じていることが徐々に明らかとなってきた。例えば、消化管の潰瘍性病変においてTFFドメインペプチド発現の増強が見られたり^{1),2)}、異所性の発現が認められたりすることから³⁾、粘膜の修復機転に関与する可能性が考えられる。あるいは、実験的に潰瘍を起こすためのエタノール、インドメタシンの投与前にリコンビナントTFFドメインペプチドを先行投与しておくと、ラットの胃粘膜障害が完全に予防されたとする報告⁴⁾や、TFFノックアウトマウスでは実験潰瘍が慢性化するという報告⁵⁾もあり、TFFドメインペプチドが防御因子として機能する可能性が考えられている。さらに、実験的胃潰瘍モデルや大腸炎モデルにリコンビナントTFF3を経口あるいは経直腸的に投与し、組織修復が促進されたという報告もあり⁶⁾、将来的に消化管疾患治療薬として臨床応用されることが期待されている。

消化管に特異的といわれているこれらペプチドが口腔にも発現していることが Jagla ら⁷⁾によって報告された。その後、耳下腺における TFF ペプチドの発現が感染の上昇を妨げている可能性を形態学的に示唆する報告⁸⁾はあるものの、現在に至るまで TFF ペプチドが口腔内における組織修復に関わるエビデンスについては解明されていない。

本研究は、TFF ペプチド、特に TFF3 が口腔粘膜において果たす防御的かつ抗菌的な役割を明らかにし、歯周病に対するワクチンとしての TFF3 の応用を目指すことを最終目的とする。本研究は、初期段階として遺伝子工学的なアプローチを試みるものである。まず、マウス組織への遺伝子導入による TFF3 の機能解析のために、動物細胞におけるタンパク発現用の遺伝子の構築を行い、大腸菌系ならびに哺乳動物細胞系への遺伝子導入およびタンパク発現により、構築したベクターの機能確認を行う。その後、新たな非ウイルス系導入剤である HVJ-エンベロープを用いてマウス個体への TFF3 遺伝子導入を行い、TFF3 ペプチドのマウス個体内での発現解析を行う。

第一章 マウス TFF3 遺伝子挿入タンパク発現ベクターの構築

【材料および方法】

マウス TFF3 遺伝子のサブクローニング

C57BL/6 マウスの小腸組織から RNA を抽出し，RT-PCR により mRNA 由来の cDNA を作製する。T4 DNA リガーゼによるライゲーションを行い，pCRTM II ベクター（図 1）への連結を行う。マウス TFF3 遺伝子挿入ベクター pCRTM II は宮崎医科大学寄生虫学講座の名和教授より供与された。

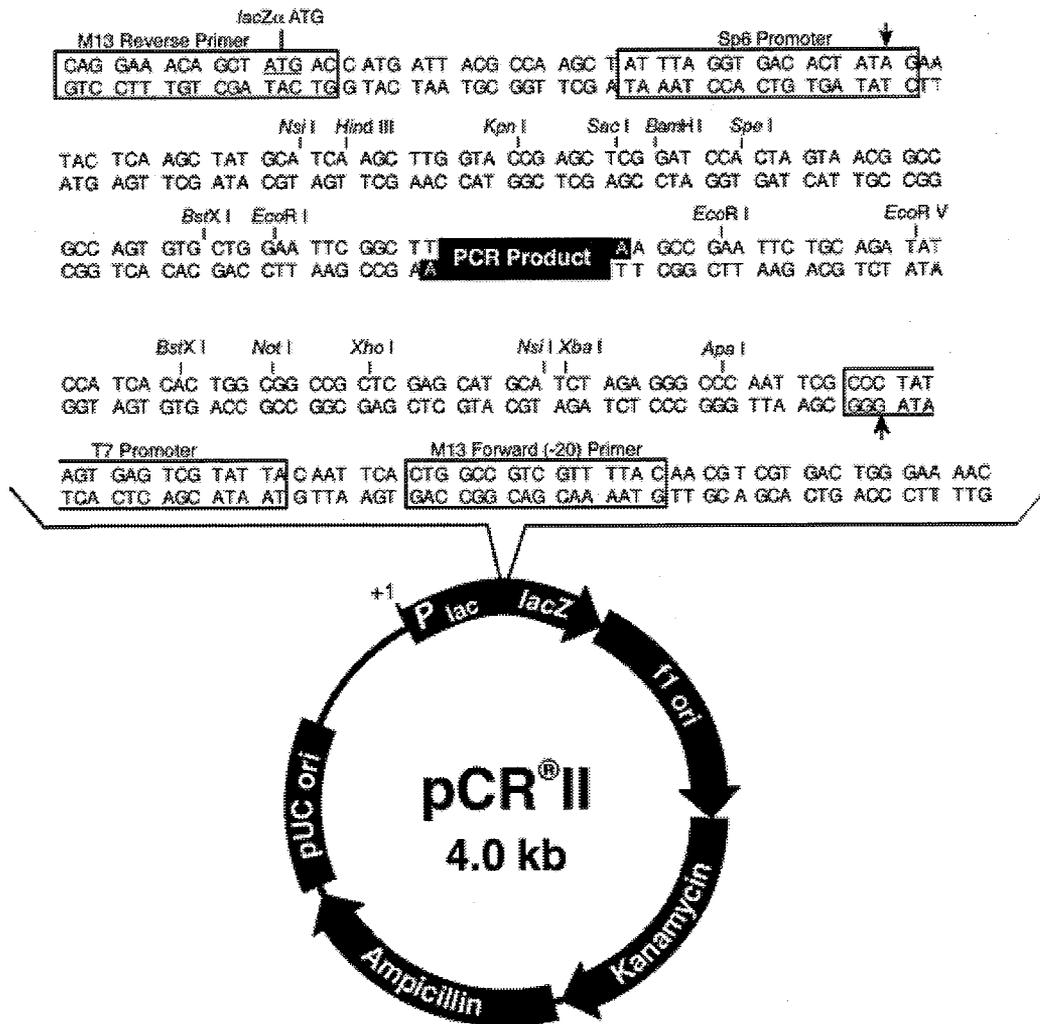


図1 ベクターマップ

タンパク発現用プラスミドの準備

His tag 融合タンパク質発現ベクターである pQE60 ベクター (QIAGEN, Germany), GST 融合タンパク質発現ベクターである PGEX-3X ベクター (GEヘルスケアバイオサイエンス, UK)ならびに pCAGGS ベクターを用意し, これらベクターに TFF3 遺伝子を連結してタンパク発現用プラスミドの構築を行う。なお, pCAGGS ベクターは大阪大学の宮崎教授より供与された。

タンパク発現用プラスミドの作製

mTFF3 連結 pCRTM II ベクターを鋳型として PCR を行う。mTFF3 遺伝子は 5'-側に *NcoI* 切断配列を, 3'-側に *BamHI* 切断配列を有した塩基配列に設計し, pCRTM II ベクターに組込んだ。Denaturing 94°C, annealing 48°C, extension 68°Cにおいて 25cycles の PCR を行い, pCRTM II ベクターに連結した mTFF3 遺伝子配列の増幅を行った。その後, 1% agarose gel を用いた電気泳動を行い, 265bp fragments を切り取り, Geanclean kit III (Q-Bio gene, USA)を用いてプロトコールに従い DNA 断片の精製を行った。

次に, クローニングキット(プロメガ, USA)を用いて TA ベクターである pEGM ベクターに連結した。すべてのプラスミドはコンピテント *E. coli* DH5 α に塩化カルシウム法によりトランスフォーメーションし, LB 培地のプレート上にて 37°C で培養を行った。培養されたコロニーを数個ピックアップし, PCR によってインサート陽性コロニーを選択する。インサート陽性コロニーは LB 液体培地にて大量培養を行い, Plasmid midikit (Qiagen)を用いてプラスミド DNA の精製を行った。シーケンス反応は DNA sequencing kit (Applied Biosystems, USA)を用いて行い, 検出は ABI PRIZM 3100 (Applied Biosystems) によって行った。塩基配列の解析はアプリケーション DNASIS を用いて行った。

pQE60 ベクターにインサート mTFF3 を連結するために, mTFF3 連結 pEGM プラスミド DNA を制限酵素 *NcoI* と *BamHI* で切断し, pQE60 ベクター連結のためのインサート mTFF3 DNA 断片を得た。マルチクローニングサイト情報 (図 2 A) により, pQE60 ベクターも制限酵素 *NcoI* と *BamHI* で切断した。*NcoI*-mTFF3-*BamHI* 断片と *NcoI*, *BamHI* 切断 pQE60 は T4 DNA ligase を使用してライゲーションを行った。上述のようにコンピテント *E. coli* JM109 を用いてトランス

フォーメーションし、LB 平板培地上でコロニー培養を行った。培養したコロニーについては Xgal を基質としたカラーセレクションを行い、インサート陽性コロニーを選択した。さらに、PCR によって mTFF3 DNA 断片の存在の有無を確認した。mTFF3 DNA 断片陽性のコロニーを LB 液体培地で大量培養し、プラスミド DNA の精製を行った。精製したプラスミド DNA はベクターマップから作製したプライマーを用いたシーケンス反応を行い、ABI PRIZM 3100 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の検出を行った。DNASIS により正しくベクターにインサートが組込まれていることを解析した。

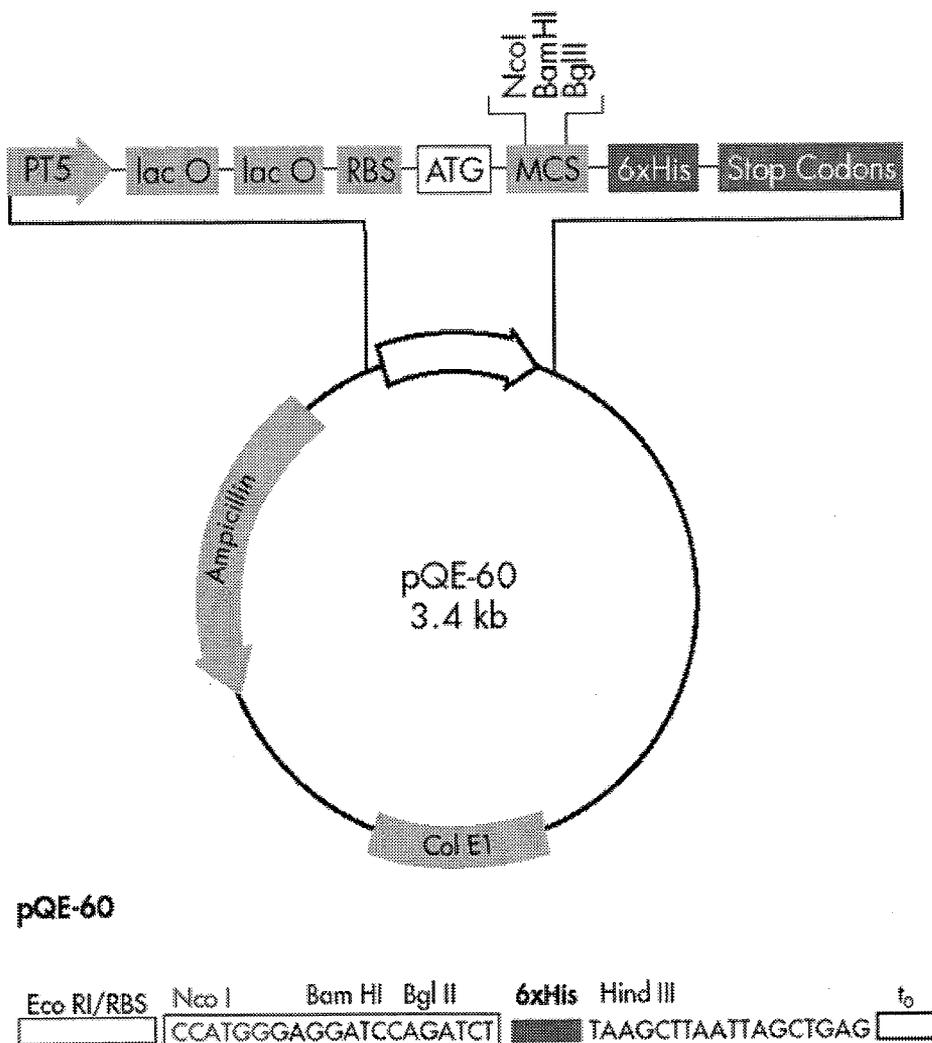


図 2 A pQE60 ベクターマップ

pGEX-3X ベクターにインサート mTFF3 を連結するために、mTFF3 連結 pEGM プラスミド DNA を用いて制限酵素によるインサートの切断を行った。pGEX-3X ベクターの MCS 情報 (図 2 B) より制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI を用いて切断を行った。pGEX-3X ベクターも同様に制限酵素による二重切断を行い、T4 DNA ligase によるライゲーションを行った。コンピテント *E. coli* DH5 α にトランスフォーメーションし、LB 平板培地にプレーティングを行い、単一プラスミドを有するコロニーの選択を行った。PCR によるインサートの確認、プラスミド DNA の精製、シークエンスにより、mTFF3 連結 pGEX-3X ベクターの構築を行った。

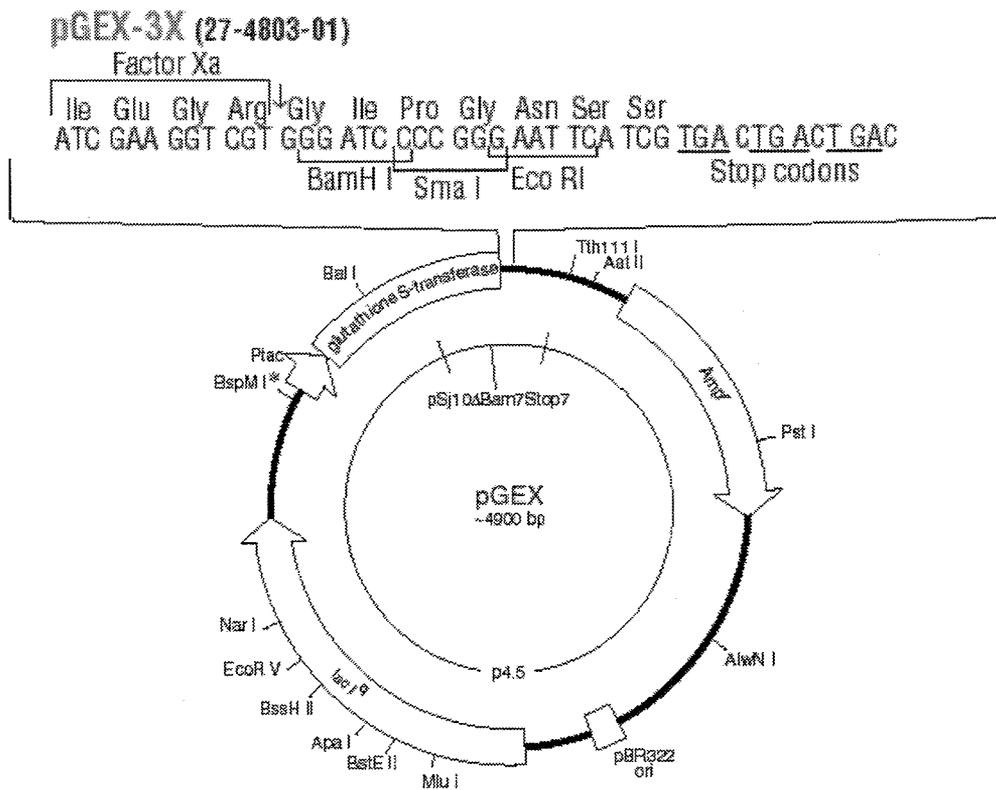


図 2 B pGEX-3X ベクターマップ

pCAGGS ベクターへのインサート mTFF3 の組み込みも上記 mTFF3 連結 pGEX-3X ベクター同様の操作を行い、mTFF3 連結 pCAGGS ベクターを作製した。なお、制限酵素については pCAGGS ベクターのマップ (図 2 C) に基づき

EcoRI を用いた。シーケンスにより作製した mTFF3 連結 pCAGGS ベクターの塩基配列の確認を行った。

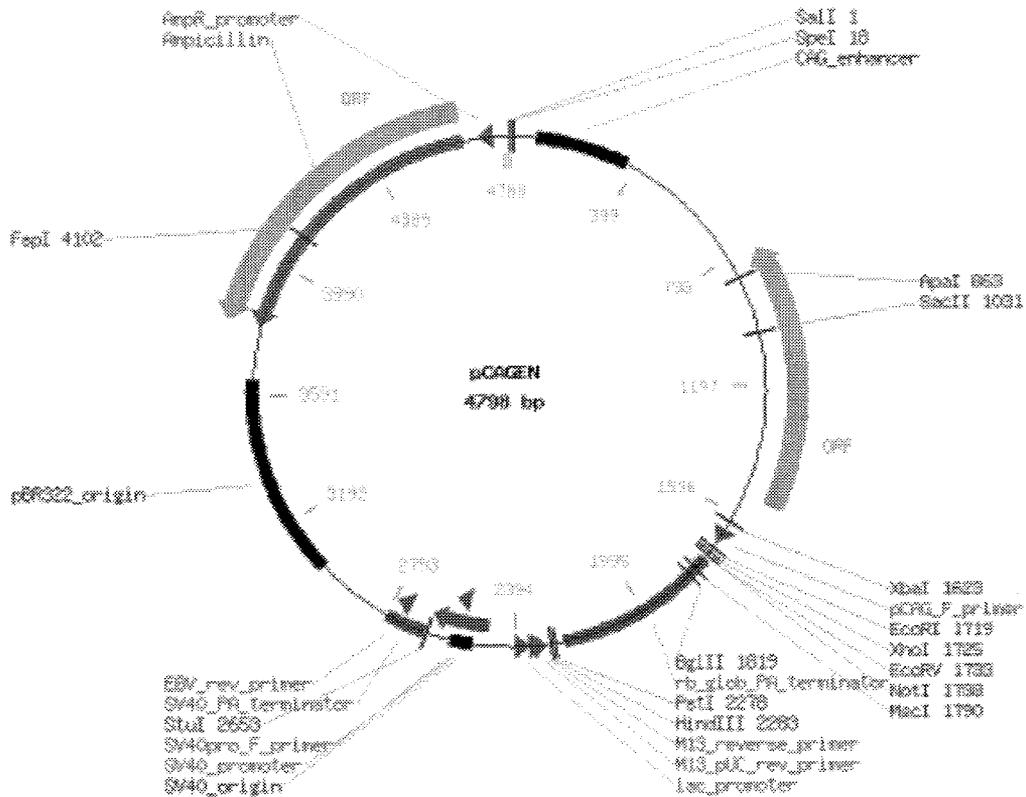


図 2 C pCAGGS ベクターマップ

タンパク発現実験

作製した mTFF3 連結 pGEX-3X ベクター, mTFF3 連結 pCAGGS ベクターをトランスフォーメーションした *E. coli* JM109 を用いてタンパク発現を行った。すなわち, ampicilin, 2% glucose を添加した LB 液体培地中で *E. coli* JM109 コロニーを 37°C, 8 時間の培養を行った。培養開始 3 時間経過後, IPTG の添加を行った。培養終了後, 遠心分離により菌体を回収し, pH7.2 の PBS で洗浄した。菌体をソニケーションにより破碎し, 1500 回転, 15 分間の遠心分離により可溶性画分と不溶性画分を得た。

SDS-PAGE 電気泳動

可溶性画分ならびに、8M 尿素添加の PBS で溶解処理をした不溶性画分は SDS-PAGE 用のバッファーと混合し、100℃、5 分の加熱処理を行った。調整した試料はポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動を行った。泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルー染色液に浸して、タンパク質の泳動パターンを検出を行った。

【結果】

TFF3 連結タンパク発現ベクターのシーケンス

His タグ融合タンパク質発現ベクター pQE60 へのインサート TFF3 マウス遺伝子連結は、TFF3 マウス遺伝子配列+36 に位置するタンパク発現開始コドン ATG から、+279 に位置するタンパク発現終了コドン TGA 直前の TTT までの全長およそ 245bp の塩基配列を用いて行った (図 3)。

```
1   atcctgtgca gtggtcctga agcttgccctg ctgccctgga gaccagagcc ctctggctaa
61  tgctgttggg ggtcctgggt gctgggtcct ctgggatagc tgcagattac gttggcctgt
121 ctccaagcca atgtatggtg ccggcaaatg tcagagtgga ctgtggctac ccctctgtca
181 catcggagca gtgtaacaac cgtggctget gctttgactc cagtatccca aatgtgccct
241 ggtgcttcaa acctctgcag gagacagaat gcacattttg aagctgtcca ggctccagga
301 agggagctct gcaccctgga ctctgctgc tgatggtggt ccaagggtag caagcatccc
361 cgatctgctc cctgctgcag gccataaag gagccaggag tctgaagaa taaagacctc
421 acagccaaca caaggctgat ctgattgctg
```

図 3 マウス TFF3 遺伝子配列

5'側のフレーム部位のシーケンスより pQE60 ベクター構造中に存在する 3'側のフレーム部位のシーケンスよりインサート TFF3 に続くと *NcoI* サイトが確認され、pQE60 ベクターとインサート TFF3 の正しい連結が確認された (図 4A)。また、3'側のフレーム部位のシーケンスよりインサート TFF3 に続く

*Bam*HI, *Bgl*II サイトが確認され、正しい連結であることが確認された。同様に、GST 融合タンパク発現ベクター pGEX-3X への連結は、TFF3 マウス遺伝子配列 +64 の GCT から +276 に位置する TTT までの全長およそ 215bp の塩基配列を用いた (図 3)。5'側のフレーム部位のシーケンスより制限酵素 *Bam*HI の配列ならびに TFF3 配列を確認し、3'側のフレーム部位のシーケンスよりインサート TFF3 に続く *Eco*RI の配列より連結が正しいことを確認した (図 4B)。哺乳動物発現ベクター pCAGGS へのインサート TFF3 の連結もシーケンス解析により確認を行った。

(A) pQE60/TFF3 シーケンス

```

5' — GAATTC ATTAAGAGGAGAAATTAACCATGG tggccc[ ]ggagaccagagccctct...
           Eco RI                               Nco I

3' — ... ggagacagaatgcacatttggatcc AGATCT CGTCACCATCACCATCACTAAGCT
                                   BamHI  Bgl II

```

(B) pGEX・3X/TFF3 シーケンス

```

5' — ATCGAAGGTCGTGGATCCgctgcagattacgttggcctgtctcca...
           BamHI

3' — ... ggagacagaatgcacattt GAATTC ATCGTGA CTGACTGACTGAC
                                   Eco RI

```

図 4 シーケンス解析

大腸菌発現系によるタンパク質発現

作製した pQE60-TFF3, pGEX・3X-TFF3 ベクターについて IPTG 添加による *E. coli* 培養実験を行い、TFF3 ペプチドの発現を確認した。pQE60-TFF3 では TFF3 ペプチドの発現 SDS-PAGE で確認することができず、タンパク発現が行われていないことが判明した。pGEX・3X-TFF3 ベクターでは、SDS-PAGE により融合した GST タンパク 27 kDa を含む推定分子量 33 kDa の位置に明確なバンドが認められた。*E. coli* 株 BL21, DH5 α , JM109 の間におけるタンパク質発現効率を比較したところ、*E. coli* JM109 株が最も顕著な目的タンパク質のバンドが認められた (図 5)。JM109 株では、可溶性画分より不溶性画分において目的タン

パク質のバンドが著明に見られ、IPTG 添加によるタンパク質発現誘導が明らかに認められた (図 5)。これらの結果より、pGEX・3X-TFF3 ベクターは大腸菌発現系において有効に機能することがあきらかになった。

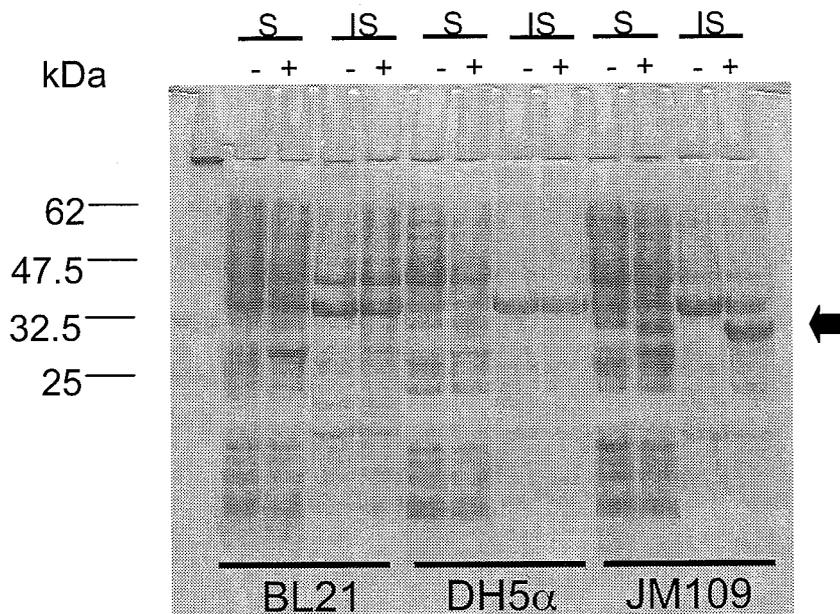


図 5 GST 融合 TFF3 タンパク質の発現

【考 察】

本研究において、タンパク質発現ベクターとして His タグ融合ベクターと GST 融合ベクターの 2 種類のベクターを用いて遺伝子導入用のベクターの構築を行った。pQE60 ベクターは C 末端に His タグを発現するように設計されたベクターで、目的タンパク質の発現が行われなければ His タグの発現は認められないという特性を有している。それゆえ、His タグ抗体による His タグの確認ができれば、目的タンパク質も発現されていることが確認できる利点があるため、ベクターとして選択した。pGEX・3X ベクターは高レベル発現系の *tac* プロモーターを採用し GST 遺伝子の C 末端に目的遺伝子を配列するように設計されたベクターである。それゆえ、大腸菌内で融合タンパクとして目的タンパク質を大量に発現することができるという利点を有している。本研究では、長所の異なる

るベクターを選択することにより、有効に機能する TFF3 ペプチド発現ベクターの構築を目指した。

pQE60 ベクターならびに pGEX・3X ベクターへの TFF3 遺伝子のサブクローニングは、pGEM-Teasy ベクターを介して行った。すなわち、TA ベクターである pGEM-Teasy に TFF3 遺伝子を組み込み、TFF3 遺伝子連結 pGEM-Teasy のクローニングを行い、このベクターから TFF3 遺伝子をサブクローニングし、最終的に pQE60 TFF3、および pGEX・3X TFF3 ベクターを作製した。シークエンス解析により TFF3 遺伝子の 5'-側および 3'-側フレーミングが正しい塩基配列であることを確認した。

大腸菌発現系を用いて pQE60 TFF3、および pGEX・3X TFF3 ベクターの TFF3 ペプチド発現を検討した。大腸菌株間にタンパク発現量の差異が存在するために、*E. coli* BL21, DH5 α , JM109 株を用いてタンパク質発現実験を行った。pQE60 TFF3 はいずれの大腸菌株においてもタンパク発現が認められなかった（結果は割愛）。それに対して pGEX・3X TFF3 はいずれの大腸菌株においても目的タンパクの発現が認められたが、*E. coli* JM109 株において最も顕著なタンパク質の発現が認められた。これらのことから、融合タンパク質として TFF3 ペプチドを発現させるベクターの方が有効であることが示唆された。このベクターを用いて大量のリコンビナント TFF3 ペプチドの生成が期待され、TFF3 ペプチドの添加実験等の汎用性が期待された。

第二章 哺乳動物細胞ならびにマウスへの TFF3 遺伝子の導入

【材料および方法】

哺乳動物細胞の培養

マウス腸管上皮由来細胞である MODE-K 細胞，サル腎臓由来細胞である COS-7 細胞ならびにヒト腸管上皮由来細胞である Caco-2 細胞を用いた。MODE-K 細胞，COS-7 細胞および Caco-2 細胞は ATCC より得た。すべての細胞は，D-glucose, 25mM HEPES, 10% FCS, 4mM L-glutamine, 50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin 添加 DMEM (Dalbecco's modified Eagle's medium) を用いて，5% CO₂ 下 37 °C にて培養を行った。

培養細胞への遺伝子導入

MODE-K 細胞，COS-7 細胞ならびに Caco-2 細胞への pCAGGS-TFF3 ベクターの導入には遺伝子導入剤である SuperFect (QIAGEN,) と HVJ-エンベロープ (石原産業，大阪) を用いて行った。いずれの導入剤も添付プロトコルに従った。すなわち，プラスミド DNA 50 μ g を無血清 DMEM 150 μ l 中に入れ混和する。これに対して SuperFect 30 μ l を添加し，5~10 分間室温放置後，血清，抗生剤添加の DMEM 1 ml 加えた。HVJ-エンベロープを用いた調整においては，プラスミド DNA 50 μ g に HVJ-エンベロープ 40 μ l およびキット中の試薬 A を混和し氷上で 5 分間放置後，試薬 B を 6 μ l 添加し遠心分離によりペレットを得た。このペレットに緩衝液 30 μ l と試薬 C 5 μ l を添加混和後，培養細胞への添加を行った。遺伝子導入に先駆けて細胞を 60 mm プレートに継代し，一晚培養を行い調整した。40~50%コンフルエントの状態の細胞に調整したプラスミドベクターを投与し，新鮮な血清添加 DMEM を加えて 24~48 時間の培養を行った。

遺伝子導入細胞からの RNA の抽出

培養後の細胞は PBS にて洗浄し，トライゾール 1 ml を培養プレートに加えてよく混和する。フェノール/グアニジン融解した細胞液を 1.5 ml エッペンチ

ューブに移し、0.2 ml のクロロフォルムを加えて激しく混和して、クロロフォルム抽出を行った。遠心分離により水層を分離し、イソプロパノールを加えて混和し、室温にて10分間放置する。15,000 rpm の遠心分離を行い、RNA の沈殿を得た。75%の冷エタノールにてRNAを洗浄し、遠心分離にて再度RNAの沈殿を得た。沈殿を風乾後、RNase free water に溶解した。

RT-PCR

抽出したRNAはoligodT primerを用いてRT反応を行った。PCRは、TFF3 sense primer ATG GAG ACC AGA GCC CTC TG, TFF3 antisense primer AAA TGT GCA TTC TGT CTC CT (240bp)を用いて、アニーリング 60 °C, エクステンション 68 °C, 25 サイクルで行った。

遺伝子導入細胞の免疫染色

遺伝子導入を行った培養細胞にトリプシン-EDTA 1 ml を加えて、接着細胞を剥離し、遠心分離により細胞の回収を行った。PBS で回収細胞を洗浄し、4%パラフォルムアルデヒドにて固定した。細胞は、PBS 洗浄にてパラフォルムアルデヒドの除去を行った後、70%エタノールに懸濁し、シリコンコートのスライドグラスに滴下、風乾して細胞標本を作製した。細胞標本は、100%メタノール処理を行い、1% BSA による室温、60 分間のブロッキング反応を行った。PBS 洗浄後、抗ラット TFF3 ビオチン化ウサギ抗体を用いて4°C、一晩の抗体反応を行った。PBS 洗浄後、ストレプトアビジン Cy3 を用いて室温、60 分間の反応を行った。PBS 洗浄後、エタノール系列（70%, 90%, 100%）に浸漬し脱水した。標本を風乾し、退色防止剤と核染用の Hoechst を添加して封入した。遺伝子発現の検出は蛍光顕微鏡（オリンパス, Germany）にて行った。

レポーター分子連結ベクターの構築

TFF3 連結 pCAGGS ベクターへレポーター分子 Green fluorescent protein (GFP) を連結するために、GFP 融合ベクター-pEGFP からサブクローニングにより GFP 遺伝子を TFF3 連結 pCAGGS に組込んだ。

マウスへの遺伝子接種

8週齢の C57BL/6 マウスを広島実験動物より購入し、実験に使用した。マウスは広島大学実験動物施設において specific pathogen free (SPF) 環境下で維持管理された。すべての実験は、広島大学の規約に則って行った。TFF3 連結 pCAGGS ベクター-DNA ならびに TFF3, GFP 連結 pCAGGS ベクター-DNA を導入剤の HVJ-エンベロープを用いて調整し、マウス腹腔内に接種した。接種後3ないし5日目にマウスを解剖し、大腸、小腸を含む各臓器を採取し、凍結ブロックを作製した。

マウス組織の病理組織染色

マウス臓器の凍結ブロックからクリオスタットを用いて薄切切片を作製した。凍結切片は固定後、ヘマトキシリン&エオジン染色を行った。また、蛍光顕微鏡による GFP の検出を行った。

【結 果】

遺伝子導入細胞における TFF3 mRNA 発現

COS-7 細胞、MODE-K 細胞および Caco-2 細胞への pCAGGS-TFF3 遺伝子の導入を行い、抽出した RNA を用いて RT-PCR を行った。図 6 は、プラスミド DNA を SuperFect を用いて COS-7 細胞へ導入後の RT-PCR 結果を示している。レーン 1, 4 が pCAGGS-TFF3 を導入した COS-7 細胞、レーン 2, 5 は pCAGGS ベクターを導入した COS-7 細胞を示している。ちなみに、レーン 3 はベクターを導入していない COS-7 細胞を、レーン 6 は MODE-K 細胞の RT-PCR である。COS-7 細胞への pCAGGS-TFF3 導入は 2 回のトライアルを行った結果である。2 回とも TFF3 mRNA の 243bp のバンドが認められた。ネガティブコントロールの pCAGGS ベクターを導入した COS-7 細胞では 2 回とも TFF3 mRNA のバンドは認められなかった (図 6)。また、ベクターを導入していない COS-7 細胞においてもバンドは認められなかった。

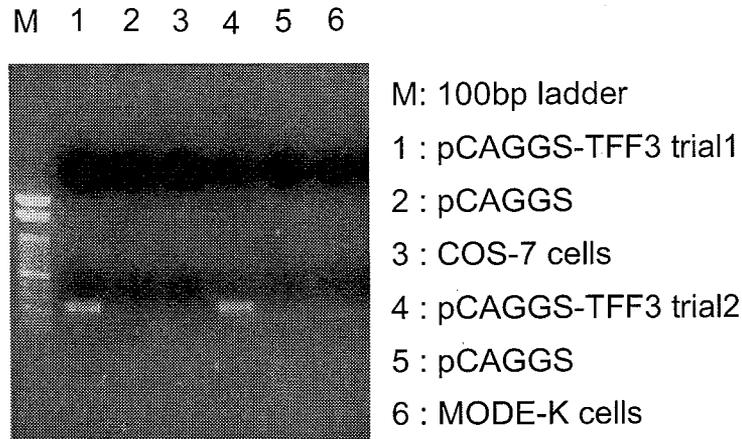


図6 COS-7細胞におけるTFF3 mRNAのRT-PCR

次に、2種類の導入剤によるMODE-K細胞、Caco-2細胞への遺伝子導入の結果を示したものが図7および図8である。図7のレーン1,2はHVJ-エンベロップを用いてMODE-K細胞への導入を行ったもので、レーン3,4はSuperFectを用いた導入結果を示している。HVJ-エンベロップ、SuperFectともpCAGGS-TFF3遺伝子によるTFF3 mRNAの243bpのバンドが認められ、TFF3の発現が確認された(図7)。ネガティブコントロールのpCAGGSベクターを導入したMODE-K細胞においてはTFF3 mRNAのバンドは認められなかった。

さらに、図8はCaco-2細胞への遺伝子導入の結果を示している。レーン1,2はHVJ-エンベロップを用いてMODE-K細胞への導入を行ったもので、レーン3,4はSuperFectを用いた導入結果を示している。MODE-K細胞における発現結果と同様の結果を示した。

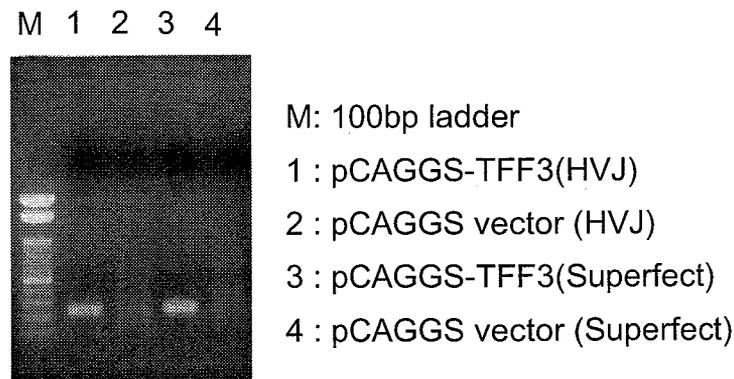


図7 MODE-K細胞におけるTFF3 mRNAのRT-PCR

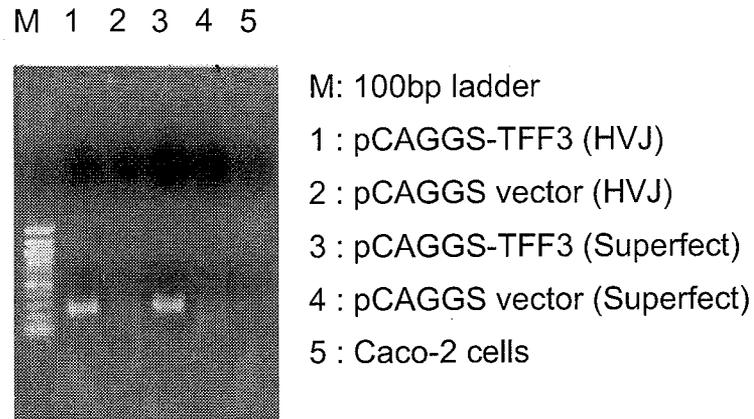


図 8 Caco-2 細胞における TFF3 mRNA の RT-PCR

図 9 は、COS-7 細胞ならびに MODE-K 細胞に対して導入剤である HVJ-エンベロープを用いて pCAGGS-TFF3 遺伝子導入を行い、細胞間の TFF3 mRNA 発現の状況を比較した結果である。レーン 1 とレーン 4 において TFF3 mRNA のバンドが認められ、いずれの細胞においても遺伝子導入、mRNA の発現が確認された。ネガティブコントロールであるレーン 2 の pCAGGS ベクターを導入した COS-7 細胞、レーン 3 の遺伝子導入を行っていない COS-7 細胞においてはバンドが認められなかったのに対して、レーン 5 の pCAGGS ベクターのみを導入したネガティブコントロールの MODE-K 細胞においては弱いバンドが認められた (図 9)。

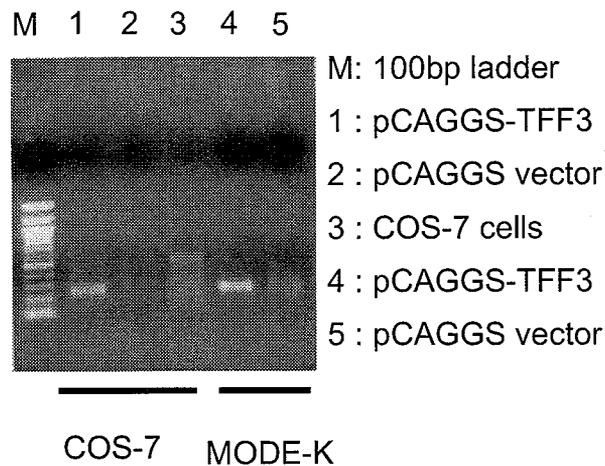


図 9 細胞種間における TFF3 mRNA の RT-PCR

遺伝子導入細胞における TFF3 タンパク質発現

遺伝子導入した細胞を TFF3 ビオチン化抗体で免疫染色した結果が図 10, 図 11 および図 12 である。図 10 は HVJ-エンベロープを用いて遺伝子を COS-7 細胞へ導入した結果を示している。上段が蛍光顕微鏡像で下段が位相差顕微鏡像を示している。pCAGGS-TFF3 遺伝子を導入した COS-7 細胞において赤い Cy3 の蛍光を発している細胞が認められ、TFF3 が発現していることが免疫染色により示された (図 10, 左)。pCAGGS 遺伝子を導入した COS-7 細胞においては非常に弱い蛍光が若干認められた (図 10, 右)。

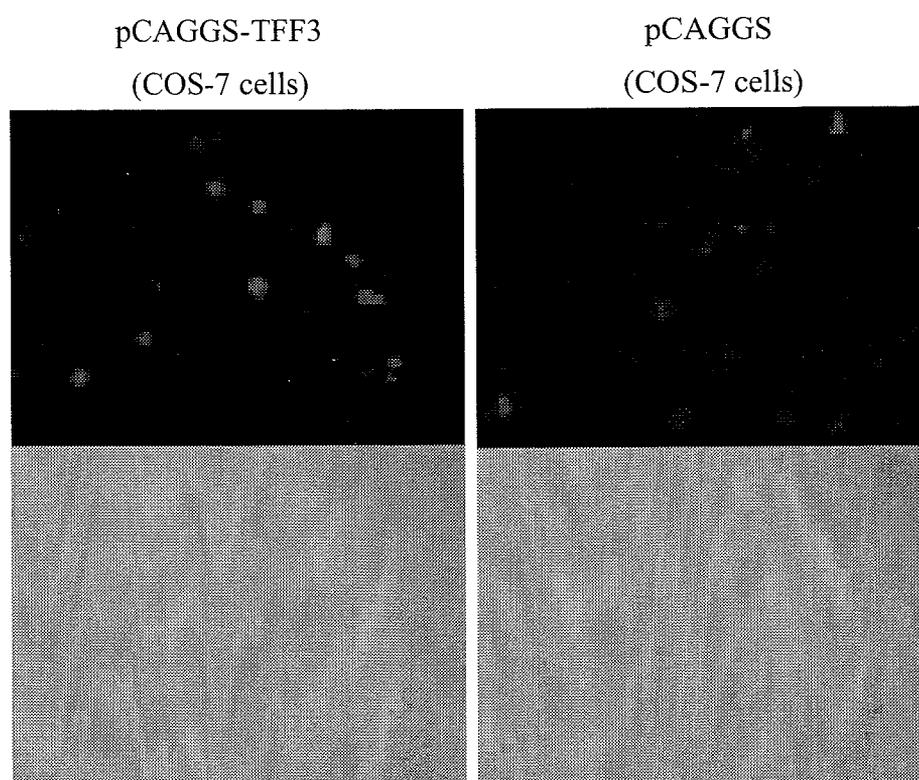


図 10 HVJ-envelope を用いて遺伝子導入した COS-7 細胞の免疫染色

図 11 は 2 種類の導入剤を用いて遺伝子を MODE-K 細胞へ導入した結果を示している。図 11-A は HVJ-エンベロープを用いて pCAGGS-TFF3 遺伝子を MODE-K 細胞に導入した結果を示し、図 11-B は SuperFect を用いて導入した結果である。いずれの導入剤においても pCAGGS-TFF3 遺伝子を導入した MODE-K 細胞で明らかな蛍光を発する細胞が認められた (図 11, 左列)。それに対し、

pCAGGS 遺伝子を導入した MODE-K 細胞ではほとんど非特異的な蛍光は認められなかった (図 11, 右列)。

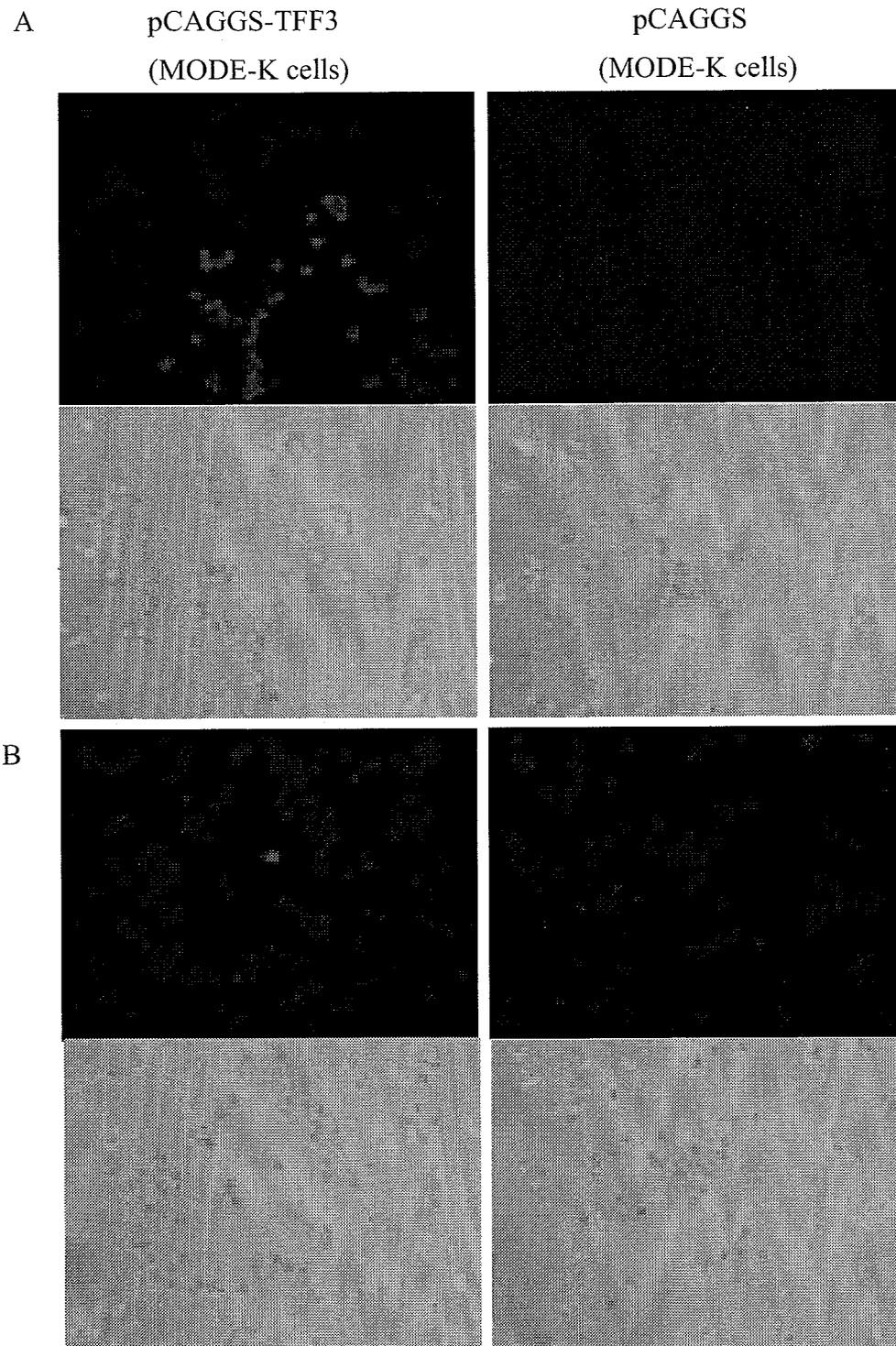


図 11 遺伝子導入した MODE-K 細胞の免疫染色

図 12 は 2 種類の導入剤を用いて遺伝子を Caco-2 細胞へ導入した結果を示している。図 12-A 左側は HVJ-エンベロープを用いて pCAGGS-TFF3 遺伝子を Caco-2 細胞に導入した結果を示し、図 11-B は SuperFect を用いて導入した蛍光顕微鏡結果を示したものである。pCAGGS ベクター遺伝子を導入した Caco-2 細胞においてもやや赤い蛍光を発する細胞が認められた (図 12-A 右側)。HVJ-エンベロープに比して SuperFect を用いて遺伝子導入した方が蛍光を発する細胞が多い傾向が示された。

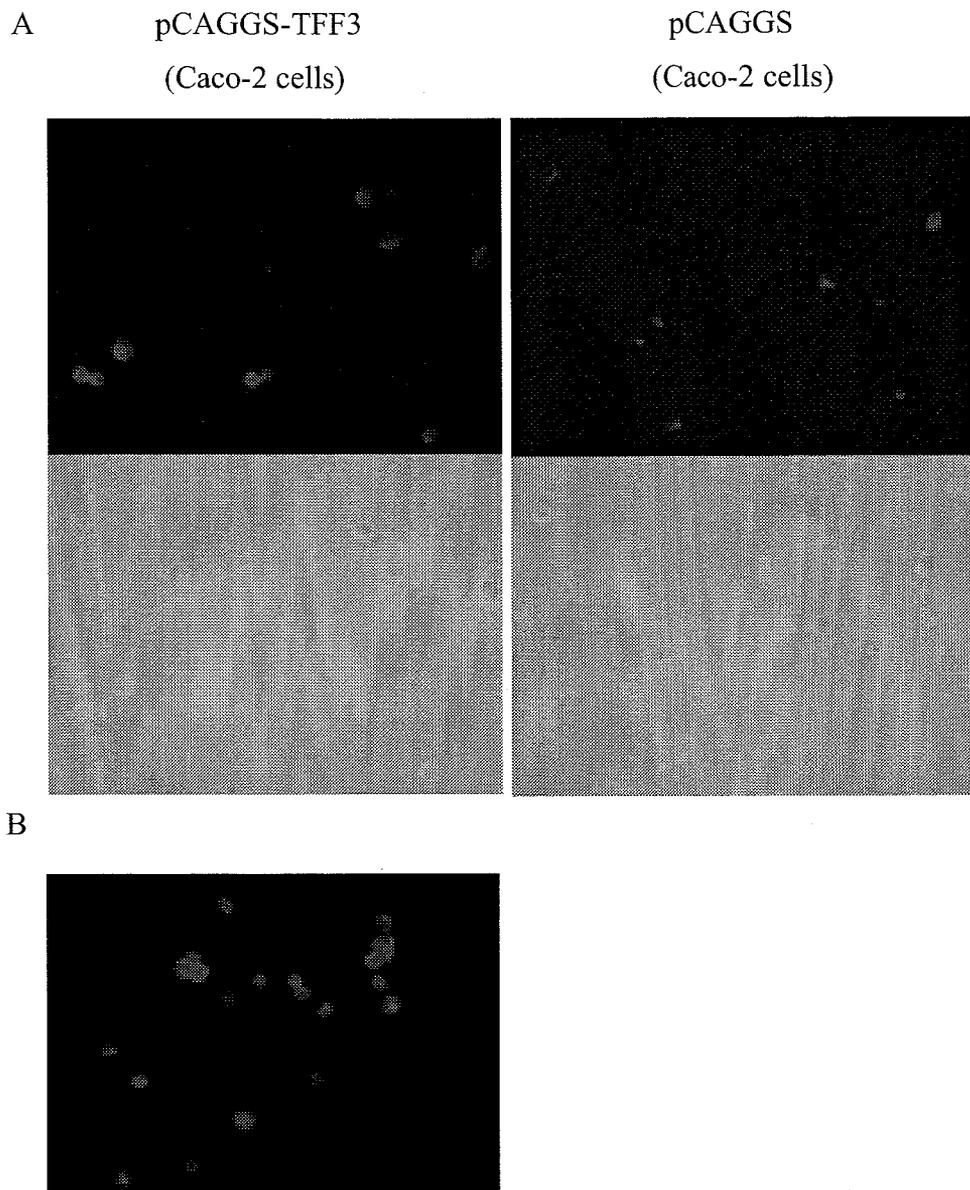


図 12 遺伝子導入した Caco-2 細胞の免疫染色

マウスへの遺伝子接種による TFF3 タンパク質発現

作製した pCAGGS-TFF3-GFP ベクターおよび pEGFP ベクターDNA を HVJ-エンベロップを用いて 8 週齢の C57BL/6J 野生型マウスへ接種を行った結果を図 13 に示す。上段最左列は HVJ-エンベロップのみを接種したマウスの小腸組織像を示しており、順に pEGFP ベクター、EDTA 共存下における pEGFP ベクター、pCAGGS-TFF3-GFP ベクターを接種したマウスの小腸組織像を示している。下段は、各々に対応する大腸組織像を示している。マウス個体内における導入遺伝子の発現は GFP の蛍光により検出された。接種したベクター間の遺伝子発現状況を比較すると、小腸において EDTA 共存下において接種した pEGFP のみで GFP の発現が認められた（上段、右から 2 列目）。同一マウスにおける大腸でもわずかな GFP 発現が検出された（下段、右から 2 列目）。しかし、pCAGGS-TFF3-GFP を含むそれ以外のベクターを接種したマウス個体では明らかな GFP 発現は認められなかった（図 13）。

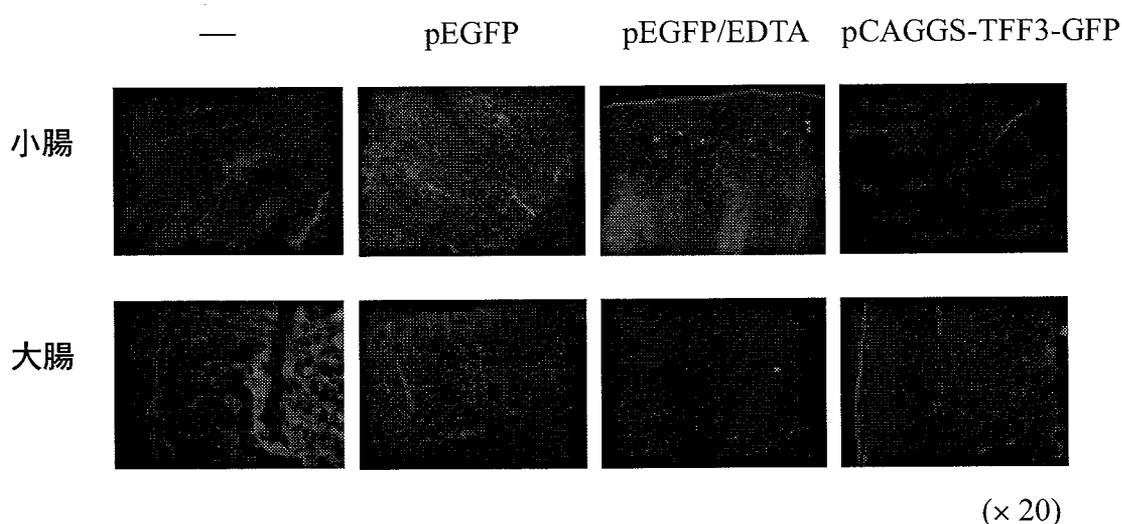


図 13 遺伝子接種マウスにおける GFP 発現

図 14 は、EDTA 共存下において pEGFP を接種したマウス小腸の蛍光顕微鏡像および H&E 染色像を示したものである。上段が蛍光顕微鏡像、下段が H&E 染色像である。GFP の蛍光発現は小腸の筋層の内側に主に認められた（図 14-A）。

その部位を拡大した蛍光像と H&E 染色像から GFP の発現はパネート細胞周辺に生じていた (図 14-B)。

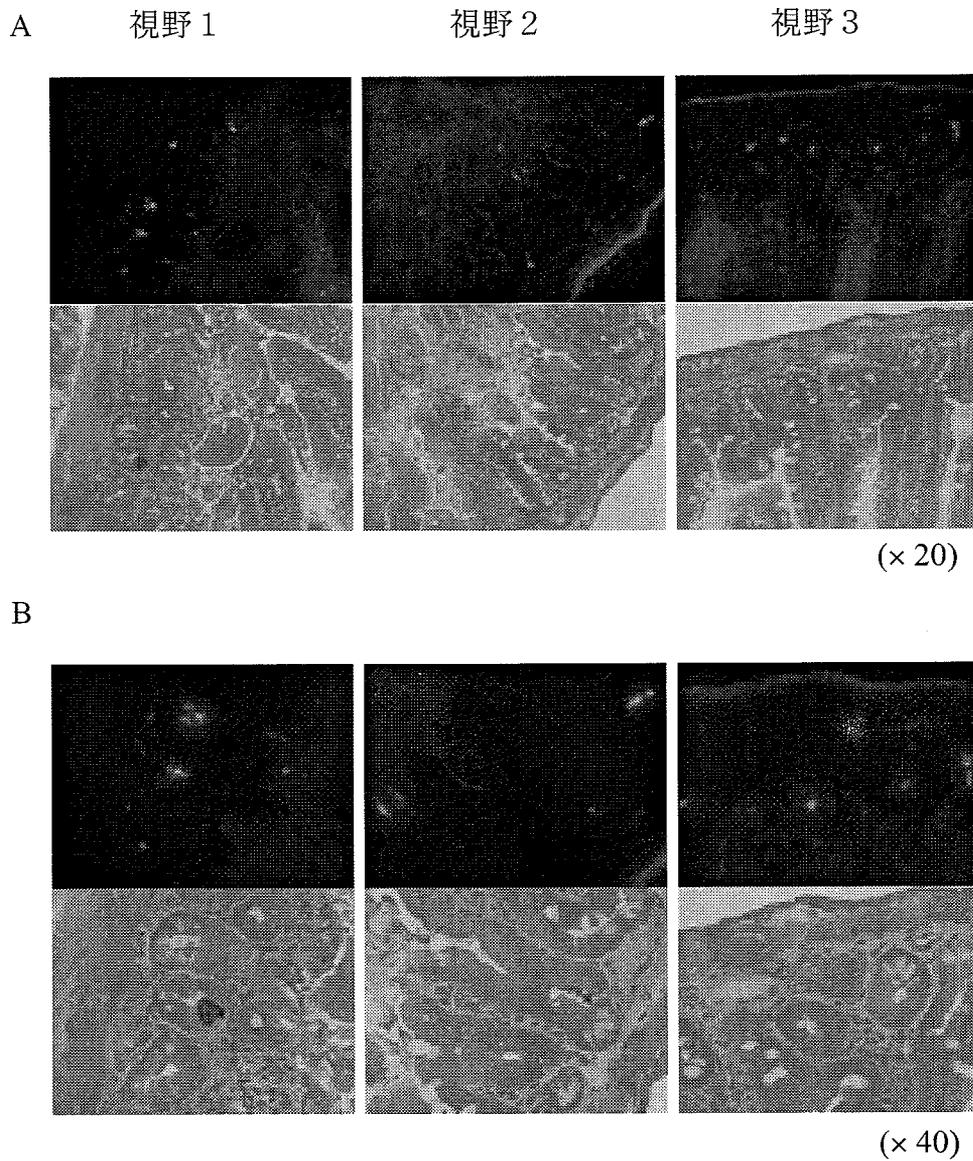


図 14 遺伝子接種マウスの小腸における GFP 発現部位

図 15 は EDTA 共存下において pEGFP を接種したマウスの小腸, 大腸以外の臓器における GFP タンパクの発現をみたものである。肝臓, 顎下腺ならびに腎臓組織における蛍光所見では, GFP の蛍光を発現している細胞がいずれの組

織においても若干見られた (図 15, 上段)。各臓器の他の視野においても同様の頻度で発現しており, 遺伝子を発現している細胞の頻度は低かった。H&E 染色像との比較による発現部位の特定は困難であった (図 15, 下段)。

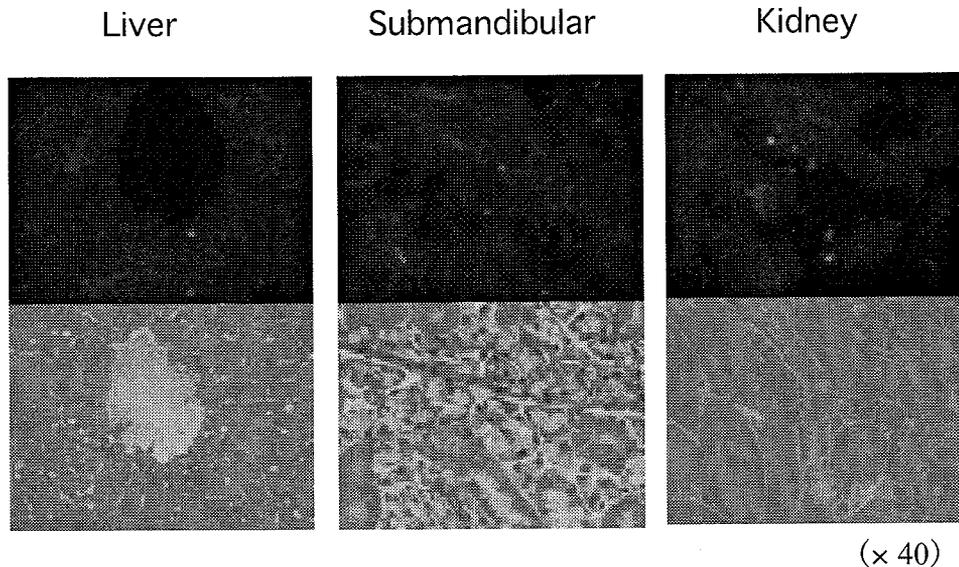


図 15 遺伝子接種マウスにおける肝臓, 顎下腺, 腎臓における GFP 発現

【考 察】

本研究では, 第 1 章で作製した TFF3 遺伝子を組み込んだレポーター分子融合のタンパク質発現用ベクターの機能解析を行うために, 動物細胞ならびにマウス個体への遺伝子導入を行いタンパク質発現機能の解析を行った。

近年, ガンを制御する遺伝子を体内に注入し, その遺伝子の働きでガンを抑制しようとする遺伝子治療の研究が盛んに行われている^{9),10)}。遺伝子治療は, 遺伝子を細胞に導入し, その発現を制御する技術が基本となっており, 遺伝子導入技術は, 疾患関連遺伝子やタンパク質の機能解析から抗原の導入による新規ワクチン開発, ひいては遺伝子治療薬等の開発に大きく貢献する。遺伝子治療の成否の鍵を握るのは, 安全でかつ効率的な遺伝子導入法である。

これまでの遺伝子治療では, 遺伝子導入剤としてレトロウィルスを代表とするウィルスの利用が主で, 低いながらもその病原性が懸念されている。本研

究で用いたセンダイウィルス (Hemagglutinating virus of Japan, HVJ) のエンベロップ (膜) はセンダイウィルスのゲノム RNA を完全に不活化したもので、ヒトや実験動物への感染性や増殖性はなく、安全な遺伝子導入ができるという特性がある。HVJ 膜エンベロップを用いた遺伝子導入の機序は、HVJ 膜エンベロップの HN タンパクが標的細胞膜上のシアル酸レセプターと特異的に結合し、細胞と接触する。その後、膜エンベロップの F タンパクの働きによって膜融合が起こり、細胞質へ導入したい分子を直接導入する¹¹⁾。非ウィルス性のトランスフェクション試薬として SuperFect を用いたが、この試薬は一定の形状の活性型デンドリマーから形成されている¹²⁾。活性型デンドリマーは中心から枝分かれし、末端には正に荷電したアミノ基を有し、核酸のリン酸基の負荷電と結合する。SuperFect 試薬と DNA の複合体は細胞表面に結合し、非特異的なエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、試薬がエンドソームの pH を変化させ、リソソームのヌクレアーゼ活性を阻害して、SuperFect-DNA の安定性を増す。非ウィルス性のトランスフェクション試薬では、貪食作用によって細胞内に取り込まれた際、導入遺伝子の多くがリソソームによって脂質とともに分解されるという欠点がある。HVJ-エンベロップでは、リソソームによる分解を受けることがないので、高い導入効率が得られると考えられる。また、HVJ-エンベロップが細胞に結合するために必要なシアル酸レセプターは、ほとんどの動物細胞や動物組織の細胞膜上に存在しているため、本研究が目指すマウス個体への遺伝子導入、タンパク質発現に有効であると考えられる。

遺伝子導入のベクターは種々の特性を持つものが存在し、使用目的に応じて選択される。本研究では、最終的に動物への遺伝子導入、タンパク質発現を目的とするため、哺乳動物でのタンパク質発現用ベクターを選択した。哺乳動物細胞におけるタンパク質発現では、形質転換効率が悪いことや発現した目的タンパク質の量の少ないことがしばしば認められ、目的タンパク質の検出が困難な場合がある。そこで、エピトープタグやレポーター分子が用いられ、これらを融合したベクターが開発されている。組換えタンパクにエピトープタグやレポーター分子を付加して発現させることにより、検出感度を亢進したり、高純度に感度よく精製したりすることも可能である。エピトープタグやレポーター分子には、6~10 残基のヒスチジンを末端に付加したタンパク質である His-tag タンパク質 (His)、細胞の増殖や分化や細胞死を制御する転写因子である c-myc、ヘマグルチニン (HA) エピトープタグ、グルタチオン s-トランスフェラーゼ

(GST) あるいはレポーター分子の GFP が存在する。本研究ではエピトープ性が低く一般的に用いられている His タグ, GST タグおよびレポーター分子の GFP を融合したベクターを選択した。His タグ融合の pQE-60 ベクターは C 末端に His タグが発現するように設計されており, 組込んだ目的遺伝子の後方に位置するため, His タグ発現の確認を行うことにより必然的に目的タンパク質の発現が検証される。GST タグ融合の pGEX-3X ベクターは N 末端側に GST タグが発現するように設計されており, 導入細胞の中で融合タンパク質として大量の目的タンパク質の発現が期待される。

His タグ融合の pQE-60 ベクターへの遺伝子導入では, ベクターの 3'-末端側に His タグ遺伝子が設計されているため, 目的遺伝子が開始コドンとともにベクターに正しくフレーミングされていることが重要であり, 連結部分のシーケンスを確認することが要求される。シーケンスにより, ATG コドンを含む 5'-側のフレーミングおよび 3'-側のフレーミングの塩基配列が確認され, TFF3 遺伝子を組入れた pQE-60 ベクターの作製が確認された (図 4)。しかし, 大腸菌系を用いた TFF3 ペプチドの発現は SDS-PAGE により確認することはできず, His タグバンドも確認できなかったことから, タンパク発現量が非常に少なかったことが示唆された。GST タグ融合の pGEX-3X ベクターにおける TFF3 遺伝子の組み込みは, 同様にシーケンスにより確認 (図 4) 後, 大腸菌系による挿入タンパク質の発現が SDS-PAGE により確認された (図 5)。サブクローニングによる挿入 TFF3 遺伝子の形質転換が成功したことが確認された。

マウスへの遺伝子導入, タンパク質発現には哺乳動物導入用のベクターが要求されるため, 本研究では pCAGGS ベクターを用いた。pCAGGS ベクターは, ユビキタスの非常に強い発現力を示す CAG プロモーター, すなわち, Cytomegalovirus enhancer と Chicken β -actin promoter とをつなげた構造と, ウサギの β -グロビン遺伝子の polyA signal サイトを持っており, 導入したい遺伝子をほぼ全身性に過剰発現させることができる¹³⁾。このベクターはタグならびにレポーター分子が融合されていないので, サブクローニング法により目的遺伝子 TFF3 ならびにレポーター分子 GFP の挿入を行い, TFF3-GFP-pCAGGS ベクターのコンストラクトを行った。

構築したベクターの機能解析のために, 哺乳動物細胞への遺伝子導入を行い, TFF3 ペプチドの発現を免疫染色により確認した。動物細胞として, Cos-7 細胞, MODE-K 細胞, Caco-2 細胞を用いた。Cos-7 細胞はサル腎臓細胞由来

であり、内在性の TFF3 の発現は認められない。マウスへ TFF3 遺伝子を導入場合、小腸等の消化管において遺伝子発現が想定されることから、マウスの小腸由来の細胞である MODE-K 細胞およびヒトの小腸由来細胞である Caco-2 細胞を用いてタンパク質発現の解析を行った。RT-PCR によりすべての細胞種において TFF3 遺伝子の発現が mRNA レベルで確認され(図 6-8)、構築した TFF3-pCAGGS ベクターが機能していることが明らかとなった。HVJ エンベロープと SuperFect の 2 種類の遺伝子導入試薬の間には遺伝子導入効率に差異は認められなかった。遺伝子を導入しない Cos-7 細胞では全く TFF3 発現が認められなかったが(図 9)、MODE-K 細胞と Caco-2 細胞では非常にわずかながらバンドが見られ(図 8, 9)、内在性の TFF3 mRNA が認められた。

TFF3 抗体を使用した免疫染色により、TFF3-pCAGGS ベクター導入細胞による TFF3 ペプチド発現の解析を行った。Cos-7 細胞、MODE-K 細胞および Caco-2 細胞においていずれの細胞でも TFF3 ペプチド発現が確認され(図 10-12)、細胞腫間の差はほとんど認められなかった。また、2 種類の遺伝子導入試薬による導入効率の差異も mRNA と同様にタンパク質発現レベルでも認められなかった(図 11, 12)。これらの結果より、発現したタンパク質レベルにおいても構築した TFF3-pCAGGS ベクターが機能していることが明らかとなった。

機能することが実証された TFF3-pCAGGS ベクターをマウスへ接種し、マウス個体内における遺伝子導入、組織における TFF3 ペプチド発現を確かめた。マウス消化管においては内在性の TFF3 ペプチドの発現が存在するため、TFF3 抗体を用いた免疫染色では内在性の TFF3 か遺伝子発現によるものかの判断が困難であるため、TFF3-pCAGGS ベクターにさらにレポーター分子を組み込んだ TFF3-GFP-pCAGGS ベクターを構築した。遺伝子導入による TFF3 ペプチド発現は GFP の蛍光を検出することにより確認が可能となる。TFF3-GFP-pCAGGS ベクターを接種したマウスにおいては GFP の蛍光は検出されず(図 13)、遺伝子導入による TFF3 ペプチド発現は確認できなかった。しかし、コントロールとした pEGFP ベクターを接種したマウスにおいて GFP の蛍光が主に小腸に認められ(図 14)、HVJ エンベロープによる遺伝子導入、タンパク質発現がマウス個体内においても確認された。これらのことから、TFF3-GFP-pCAGGS ベクターの導入 DNA 量の検討、あるいは pEGFP ベクターへの TFF3 遺伝子の組み込みによるベクターの再構築に必要が示唆された。

【総括】

本研究では、組織修復・抗菌因子である TFF3 ペプチドを用いた遺伝子導入による機能解析を行った。哺乳動物への遺伝子導入を行うためのベクターの選択、サブクローニングによる TFF3 遺伝子のベクターへの組込みを行い、TFF3-pQE-60 ベクター、TFF3-pGEX-3X ベクター、TFF3-pCAGGS ベクターのタイプの異なるベクターを構築した。

大腸菌系ならびに細胞系を用いたタンパク発現により、作製した TFF3-pGEX-3X ベクター、TFF3-pCAGGS ベクターの機能が確認された。これらベクターは mRNA、TFF3 ペプチドレベルにおいて TFF3 が発現することが RT-PCR 法と TFF3 抗体による免疫染色法により確認できた。

本研究で用いた非ウイルス系のトランスフェクション試薬である HVJ-エンベロープはカチオン系のトランスフェクション試薬である SuperFect と同等の遺伝子導入効率を示し、動物個体への導入に十分使用し得ることが示された。

マウスへの TFF3-GFP-pCAGGS ベクター、pEGFP ベクターの接種実験により、HVJ-エンベロープによりマウス個体への遺伝子導入が成功したこと、それによる GFP ペプチドの発現が生じたことが確認された。しかし、TFF3-GFP-pCAGGS ベクターにおいては GFP の発現が検出できず、さらなる導入条件の検討、ベクターの再構築の必要性が示唆された。

【文 献】

- 1) Enami S, Rodrigues S, Rodrigues CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E and Gespach C. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 25: 885-898, 2004.
- 2) Kim B-W, Kim K-M, Lee B-I, Maeng L-S, Choi H, Cho S-H, Chae H-S, Kim J-K, Choi K-Y and Chung I-S. Expression of trefoil peptides in the suctypes of intestinal metaplasia. *Peptides* 25: 779-783, 2004.
- 3) Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L and Holmskov U. Tissue Localization of Human Trefoil Factor 1, 2 and 3. *J Histochem. Cytochem.* 2007 Jan ; [Epub ahead of print]
- 4) Mckenzie C, Thim L and Parsons ME. Topical and intravenous administration of trefoil factors protect the gastric mucosa from ethanol-induced injury in the rat. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14: 1033-1040, 2000.
- 5) Mashimo H, Wu D-C, Podolsky DK and Fishman MC. Impaired Defense of Intestinal Mucosa in Mice Lacking Intestinal Trefoil Factor. *Science* 274: 262-265, 1996.
- 6) Mahmood A, Mellley L, Fitzgerald AJ, Ghosh S and Playford RJ. Trial of trefoil factor 3 enemas, in combination with oral 5-aminosalicylic acid, for the treatment of mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 21: 1357-1364, 2005.
- 7) Jagla W, Wiede A, Hinz M, Dietzmann K, Gulicher D, Gerlach KL and Hoffmann W. Serection of TFF-peptides by human salivary glands. *Cell Tissue Res.* 298: 161-166, 1999.
- 8) Kutta H, May J, Jaehne M, Munscher A and Paulsen FP. Antimicrobial defence mechanisms of the human parotid duct. *J. Anat.* 208: 609-619, 2006.

- 9) Miyagi M, Aoyagi K, Kato S and Shirouzu K. The TIMP-gene transferred through adenovirus mediation shows a suppressive effect on peritoneal metastases from gastric cancer. *Int J Clin Oncol.* 12: 17-24, 2007.
- 10) Peer D, Zhu P, Carman CV, Lieberman J and Shimaoka M. Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNA to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 104: 4095-4100, 2007.
- 11) Kaneds Y and Tabata Y. Non-viral vectors for cancer therapy. *Cancer Sci.*, 97: 348-354, 2006.
- 12) Tang MX, Redemann CT and Szoka Jr. FC. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjugate Chem.*, 7: 703, 1996.
- 13) Niwa H, Yamada K and Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfections with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108: 193-200, 1991.