

所属 (主指導教員)	バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座 (河野 憲二 教授)		
氏名	古川 智久	提出	平成18年12月25日
題目	毒素受容体を用いた細胞ノックアウト法 (TRECK 法) の改良と応用		

要旨

動物個体内で特定の細胞のみを除去する手法 (細胞ノックアウト法) は, 細胞の生理機能を解析する時や, 細胞移植実験などに必要となる臓器不全の疾患モデル動物を作製する時に役立つ。そこで, 動物個体内の特定の細胞のみを任意の時期に除去できる, 毒素受容体を用いた細胞ノックアウト法 (Toxin receptor mediated cell knockout, TRECK 法) が開発された。TRECK 法は, 野生型マウスがジフテリア毒素 (DT) に対して耐性を持っていることに着目し, DT 受容体として機能するヒト Heparin-Binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) を特定の細胞のみで発現させたトランスジェニックマウスを作製し, 任意の時期に DT を投与することで, その細胞のみを除去できる手法である。しかしながら毒素受容体として用いるヒト HB-EGF は EGF 受容体を活性化させる増殖因子で, 過剰発現させた組織や個体に異常を生じる可能性が考えられる。また HB-EGF は膜結合型のタンパク質として合成された後プロテアーゼにより切断され分泌型となるが, 分泌型となったヒト HB-EGF は DT 受容体として機能しない。そこで, DT 受容体機能を保持しつつ増殖因子活性を失い, プロテアーゼによる切断が起こらない変異型ヒト HB-EGF を作製することで, TRECK 法の改良を行うことを考えた。

これまでに生化学的な実験や X 線結晶構造解析により報告されている, ヒト HB-EGF で DT との結合に重要なアミノ酸や, HB-EGF と同じ EGF ファミリーに属するヒト EGF で EGF 受容体との結合に重要なアミノ酸の情報を利用した。そして, DT との結合部位を破壊することなく EGF 受容体との結合活性を減少させることを考えて, ヒト HB-EGF の細胞外の EGF 様ドメインの 5 ヶ所のアミノ酸を置換した変異型ヒト HB-EGF を作製し, 培養細胞に導入して調べた。その結果, 2 つの有効な変異体を得ることに成功した。そのうちの 1 つである I117A/L148V 変異型ヒト HB-EGF は, DT 受容体能に関しては野生型に比べ 1/10 程度に低下してはいるものの, 増殖因子活性をほぼ完全に失った変異体であった。もう 1 つの I117V/L148V 変異型ヒト HB-EGF は, DT 受容体機能は野生型と同程度に保持しており, かつ増殖因子活性を大幅に低下した変異体であった。さらにこれら 2 つの変異型ヒト HB-EGF を発現した細胞へ, 膜結合型 HB-EGF の切断を促すことが知られている 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 刺激を加えて調べたところ, TPA 刺激による切

断断片はほとんど検出できず，これら 2 つの変異型ヒト HB-EGF は，プロテアーゼによる切断に耐性を持っていることも明らかとなった。

次にこれら 2 つの変異型ヒト HB-EGF について，マウス個体で用いた時の有用性を調べた。これまでに，野生型 HB-EGF を全身で発現するトランスジェニックマウスは出生後に発現誘導する方法を用いなければ得ることができず，胎児期の HB-EGF の過剰発現は致死となる可能性が報告されていた。そこで，全身で遺伝子を発現させるプロモーターを用いて，野生型，I117A/L148V と I117V/L148V 変異型のそれぞれのヒト HB-EGF を発現するトランスジェニックマウスが得られるかどうかを調べた。それぞれ 100 匹程度ずつのマウスが誕生するまで受精卵へのトランスジーンへのインジェクションを行った。その結果，血液中の細胞でトランスジーンが発現が確認できたラインは，野生型では 2 ラインしか得られなかったのに対して，I117A/L148V と I117V/L148V 変異型ではそれぞれ 14 ラインと 17 ラインずつ得られ，トランスジーンを発現したマウスが得られた割合は高かった。野生型ヒト HB-EGF を発現するマウスが誕生したことはこれまでの報告とは異なったが，増殖因子活性が減少していた I117A/L148V または I117V/L148V の変異型ヒト HB-EGF は，胎児期の過剰発現による致死性を回避できる可能性が高いと考えられる。したがってこれまでの結果を合わせると，I117A/L148V または I117V/L148V の変異型ヒト HB-EGF は，TRECK 法に用いる毒素受容体として適していると結論づけられる。

また TRECK 法のさらなる応用を目指し，TRECK 法を用いて脳細胞を特異的に除去することが可能であるかどうかを調べた。TRECK 法では，血液中に投与した DT が血液の循環によって細胞表面のヒト HB-EGF に到達することで，標的細胞を除去する。しかし脳細胞を標的として TRECK 法を用いる時は，58kDa の大きさのタンパク質である DT が血液脳関門を通過できるかどうか問題となる。そこで，中枢神経系のミエリンを構成するタンパク質の 1 つである myelin basic protein (MBP) 遺伝子のプロモーターを用いて，ヒト HB-EGF 遺伝子をオリゴデンドロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製しその検証を行った。脳組織特異的にヒト HB-EGF の発現が確認できたラインのトランスジェニックマウスの腹腔内に DT を経時的に投与し，脳組織を免疫組織染色法により観察した。その結果，小脳において標的としたオリゴデンドロサイトのマーカーである 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNase) の減少が確認できた。一方，アストロサイトのマーカーである Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) の減少は見られなかった。よってマウスの腹腔内に投与した DT は，特別な処置を行わなくても血液脳関門を通過し，ヒト HB-EGF を発現させたオリゴデンドロサイト特異的に障害を与えたことが示された。腹腔内への DT 投与量と脳内標的細胞への障害の程度との関連など検討すべき課題は残っているが，TRECK 法を用いて脳細胞を特異的に除去することは可能であると考えられる。

今後，本研究で作製した変異型ヒト HB-EGF を毒素受容体として利用することや，脳内の細胞も標的とすることで，TRECK 法を用いた研究の幅が広がることが期待される。

毒素受容体を用いた細胞ノックアウト法  
(TRECK法)の改良と応用

古川 智久

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学講座

(河野 憲二 教授)

平成 19 年 1 月 29 日提出

## 目次

### 第 1 部：TRECK 法に用いる毒素受容体の改良

序論	8
材料と方法	14
細胞、WEHI-3 培養上清および DT	14
プラスミド・コンストラクション	14
PCR 法を用いた部位特異的変異導入法	16
レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法	16
リン酸カルシウム法による遺伝子導入法	17
膜結合型 HB-EGF の切断確認	17
培養細胞からタンパク質の回収	17
Western Blot	17
培養細胞の DT 感受性測定	18
共培養によるヒト HB-EGF の増殖因子活性測定	18
分泌型ヒト HB-EGF の増殖因子活性測定	19
膜結合型ヒト HB-EGF の増殖因子活性測定	19
DNA 合成量の測定	19
生細胞数の測定	19
トランスジェニックマウスの作製	20
マウスゲノム DNA の回収	20
Southern Blot	20
PCR 法による genotyping	21
マウス組織から RNA の回収	21
Northern Blot	21
マウス個体への DT 腹腔内投与	22
血液中 GPT 活性の測定	22
初代培養肝細胞の調整	22
初代培養肝細胞の DNA 合成量	23
初代培養肝細胞の DT 感受性	23
マウス血液中 DT 濃度の測定	23
マウス血液から RNA の回収	23

血液由来 RNA の RT-PCR	24
マウス組織からタンパク質の回収	24
統計学的解析	25
<b>結果</b>	<b>30</b>
<b>【 1 】 非切断変異型 ( L148S/P149T ) ヒト HB-EGF の解析</b>	
(1-1) 肝炎モデルマウスを用いた解析	30
L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF	30
L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF の増殖抑制効果	30
トランスジェニックマウスの作製	31
トランスジーンの発現確認	31
DT 投与後の血液中 GPT 活性の比較	32
初代培養の肝細胞を用いた解析	32
血液中 DT 濃度の測定	33
(1-2) 培養細胞を用いた実験系の検証	45
強制分泌型での増殖因子活性	45
増殖因子活性測定系の検証	45
ホルマリン固定時の増殖因子活性	46
<b>【 2 】 新たな変異型ヒト HB-EGF の探索と解析</b>	
(2-1) 培養細胞を用いた探索と解析	50
変異挿入アミノ酸残基の検討	50
レトロウイルス感染細胞の発現確認	51
ヒト HB-EGF 導入細胞での増殖因子活性	51
ヒト HB-EGF 導入細胞での DT 感受性	51
分泌型ヒト HB-EGF の増殖因子活性	52
膜結合型ヒト HB-EGF の切断確認	52
膜結合型ヒト HB-EGF の増殖因子活性	53

(2-2) トランスジェニックマウスを用いた解析	65
トランスジーンの構築と培養細胞での解析	65
トランスジェニックマウスの作製	65
トランスジーンの発現確認	66
考察	75
肝炎モデルマウスを用いた解析	75
膜結合型 HB-EGF の増殖抑制効果	76
新たな変異型ヒト HB-EGF のアミノ酸置換部位	76
非切断変異型ヒト HB-EGF	77
TRECK 法に用いる毒素受容体の候補	78
ヒト HB-EGF 全身発現マウスを用いた解析	79
まとめ	79
図 1-1 DT の作用機序	11
図 1-2 TRECK 法の概要	12
図 1-3 HB-EGF の構造	13
図 1-4 プラスミドマップ	28
図 1-5 レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の概要	29
図 1-6 L148S/P149 変異型ヒト HB-EGF の切断確認	34
図 1-7 膜結合型 HB-EGF の増殖抑制効果を調べる実験系	35
図 1-8 L148S/P149 変異型ヒト HB-EGF の増殖抑制効果	36
図 1-9 肝炎モデルマウスの Southern Blot	37
図 1-10 肝炎モデルマウスの Northern Blot	38-39
図 1-11 DT 投与後の血液中 GPT 活性の比較	40
図 1-12 初代培養肝細胞の DNA 合成	41
図 1-13 TPA 刺激時の DT 感受性	42
図 1-14 血液中 DT 濃度の測定	43
図 1-15 強制分泌型での増殖因子活性	47
図 1-16 ヒト HB-EGF 増殖因子活性測定系の検証	48
図 1-17 ホルマリン固定時の増殖因子活性	49
図 1-18 変異導入アミノ酸残基の検討	54-55
図 1-19 レトロウイルス感染細胞の発現確認	56
図 1-20 増殖因子活性測定系の模式図	57

図 1-21	ヒト HB-EGF 導入細胞の増殖因子活性	58
図 1-22	ヒト HB-EGF 導入細胞の DT 感受性	59
図 1-23	分泌型ヒト HB-EGF の産出量の確認	60-61
図 1-24	分泌型ヒト HB-EGF の増殖因子活性	62
図 1-25	膜結合型ヒト HB-EGF の切断確認	63
図 1-26	膜結合型ヒト HB-EGF の増殖因子活性	64
図 1-27	GFP 融合型ヒト HB-EGF 発現細胞の DT 感受性	67
図 1-28	Hela 細胞へ導入した時の GFP 蛍光と Western Blot	68-69
図 1-29	血液由来 RNA の RT-PCR	70
図 1-30	マウス組織の Western Blot	71-72
表 1-1	PCR プライマーの配列	26-27
表 1-2	肝炎モデルマウスの解析結果	44
表 1-3	ヒト HB-EGF 全身発現マウスの解析結果	73-74
表 1-4	ヒト HB-EGF 全身発現マウスの統計学的解析結果	81

## 第 2 部：脳細胞を標的とした TRECK 法の応用

序論	83
材料と方法	87
MBP-HBEGF マウスの作製, genotyping, Northern Blot	87
HE 染色	87
免疫組織染色法	88
BBB の透過性	88
初代培養神経細胞の調整	88
結果	90
MBP-HBEGF トランスジェニックマウス	90
DT 腹腔内投与後の脳組織切片の観察	90
DT 投与後の BBB 透過性	91
DT 投与条件の検討	92
マウス神経細胞の DT 感受性	92

考察	101
MBP-HBEGF トランスジェニックマウスの解析	101
DT 投与後の BBB 透過性の検証	102
マウス神経細胞の DT 感受性	102
まとめ	103
図 2-1 MBP-HBEGF マウスの Northern Blot	94-95
図 2-2 HE 染色による脳組織の観察	96
図 2-3 免疫組織染色法による脳組織の観察	97
図 2-4 DT 投与後の BBB 透過性	98
図 2-5 DT 投与後の Northern Blot	99
図 2-6 マウス神経細胞の DT 感受性	100
謝辞	104
参考資料	105
参考文献	109

## 第 1 部

### TRECK 法に用いる毒素受容体の改良

## 序論

組織や細胞の生体内での機能を明らかにするために、その組織や細胞を欠失させ影響を検討するという手法がある。一方、糖尿病やアレルギー性疾患のように、特定の細胞の障害や活性化が直接的引き金となって引き起こされる疾患は多い。そのため、疾患に關与する細胞を欠いた動物を作製することは、その疾患のメカニズムや治療法の研究を行うのに有用である。特に、幹細胞探索などのための細胞移植実験には、特定の臓器不全モデル動物が必要とされる。このように動物個体内で特定の細胞のみを除去する手法（細胞ノックアウト法）は、細胞の生理機能を解析する時や、種々の研究に利用される疾患モデル動物を作製する時に役立つ。

そのためには、組織や細胞を外科的に取り除く方法や目的とする細胞に毒素遺伝子を特異的に発現させる方法が挙げられる（Palmiter et al., 1987; Breitman et al., 1987; Borrelli et al., 1988; Heyman et al., 1989; Lowell et al., 1993; Ross et al., 1993）。しかし目的とする細胞が個体内に散在する時には、前者の方法ではその細胞だけを効率よく除去することは不可能である。また目的とする組織や細胞が発生過程に必須な場合、後者の方法では胎児期に死亡し、出生後の解析が不可能となる。そこで当研究室では、動物個体内の特定の細胞のみを任意の時期に除去できる、毒素受容体を用いた細胞ノックアウト法（Toxin Receptor-mediated Cell Knockout, TRECK 法）を開発した（Saito et al., 2001; 齊藤博士論文 2005）。

TRECK 法は、ジフテリア毒素（DT）に見られる、次のような性質を利用している。DT は、A と B の 2 つのフラグメントから構成され、B フラグメントを介して細胞表面にある Heparin-Binding EGF-like Growth Factor（HB-EGF）と結合することによって（Naglich et al., 1992）細胞内に取り込まれる。その後、A フラグメントがサイトゾルへ移行し、ペプチド鎖伸長因子 2（EF-2）を ADP リボシル化し不活性化することでタンパク質合成を阻害し、細胞を死に至らしめる（図 1-1; Honjo et al., 1968; Pappenheimer, 1977; Kohno et al., 1986; Mekada et al., 1988; Moskaug et al., 1991）。A フラグメントは、サイトゾルに 1 分子存在するだけで、すべての真核生物由来の細胞を死に至らしめる活性をもつが（Yamaizumi et al., 1978）、DT に対する感受性は動物種間によって異なり、ヒト由来の細胞は DT に対して感受性が高いが、マウス由来の細胞は極めて低いことが知られている。この感受性の違いは、DT 受容体として働く HB-EGF のアミノ酸配列がヒトとマウスで異なり、ヒト HB-EGF には DT が結合するが、マウス HB-EGF には DT が結合しないことによって生じている（Mitamura et al., 1995）。そこで、ヒト HB-EGF 遺伝子を特定の組織や細胞特異的に発現させるプロモーターにつなげ

てマウスの受精卵に導入すると、その組織や細胞のみでヒト HB-EGF を発現するトランスジェニックマウスが得られる。そして任意の時期にその個体へ DT を投与することで、ヒト HB-EGF を発現した細胞のみに障害を与えることが可能となる。実際、肝臓組織特異的に発現するアルブミン遺伝子のエンハンサー/プロモーターの下流にヒト HB-EGF 遺伝子をつなげて導入したトランスジェニックマウスに DT を投与することで、劇症肝炎様症状を誘発できることが示された (図 1-2; Saito et al., 2001; 齊藤博士論文 2005)。

しかしながら TRECK 法は、毒素受容体としてヒト HB-EGF を用いることで、考えなければならない次のような問題点を含んでいる。

HB-EGF は、ヘパリン結合ドメイン、EGF 様ドメイン、膜貫通ドメインと細胞質ドメインを含む膜結合型のタンパク質として合成され (図 1-3)、DT 受容体としても機能する膜結合型 HB-EGF は、細胞表面で A disintegrin and metalloprotease (ADAM) ファミリーのプロテアーゼにより細胞外領域が切断され分泌型となる (Izumi et al., 1998; Asakura et al., 2002)。そして分泌されたヒト HB-EGF は、BALB-3T3 細胞などのマウス細胞を含めた、様々な細胞に対して増殖活性を持っている (Higashiyama et al., 1991)。このように HB-EGF は EGF ファミリーに属する増殖因子で、EGF や他の EGF ファミリーのタンパク質と同様に EGF 受容体に結合しリン酸化の刺激となる。これまでに初代培養の実験より、HB-EGF はラットの肝実質細胞 (Ito et al., 1994) やマウス胎児肝臓の上皮細胞 (Kawasaki et al., 2005) の DNA 合成を増加させることが報告されている。また、HB-EGF の mRNA の発現はラットの肝臓再生時に増加すること (Kiso et al., 1995) や、部分的肝切除後の肝臓の DNA 合成は HB-EGF を投与したマウスでは増加するが HB-EGF ノックアウトマウスでは遅れる (Mitchell et al., 2005) ことが報告されており、HB-EGF が肝臓の再生に重要な働きをしていることが示されている。肝臓組織特異的にヒト HB-EGF を過剰発現させたトランスジェニックマウスは、通常の飼育条件下では異常は見られなかった (Saito et al., 2001) が、肝切除を行うとその後の肝実質細胞の増殖の加速が見られた (kiso et al., 2003) さらに、膜結合型 HB-EGF を切断するプロテアーゼの阻害剤により心肥大が抑えられたこと (Asakura et al., 2002)、HB-EGF の過剰発現により脾臓の繊維化が見られたこと (Means et al., 2003)、HB-EGF ノックアウトマウスでは心臓や心臓弁の発生に異常が生じること (Iwamoto et al., 2003; Jackson et al., 2003) など、HB-EGF は生体内においても重要な働きをしていることを示唆する報告がなされている。

このような働きのほとんどは分泌型 HB-EGF の作用によるものであると考えられる。一方これまでに、分泌型 HB-EGF が細胞増殖を促進するのに対し、膜結合型 HB-EGF には増殖を抑制する働きがあるという報告がある (Iwamoto et al.,

1999)。この報告では、EGF や HB-EGF 依存的に増殖する DER 細胞を、増殖に十分な量の EGF の存在下で HB-EGF を発現させた細胞と共に培養すると、DER 細胞の増殖は抑制されアポトーシスを起こすことが示されている（図 1-7）。そして分泌型のみの作用を見る実験と比較を行うことにより、この増殖抑制効果は HB-EGF の膜結合型の作用によるものであるとされている。このように膜結合型 HB-EGF は、分泌型の単なる前駆体ではなく、活性を持ち、膜に結合した状態で隣接する細胞にシグナルを伝えていると考えられている。

よって TRECK 法では、標的細胞に増殖因子として機能するヒト HB-EGF を過剰発現させることにより、組織や個体に異常を生じる可能性がある。また膜結合型 HB-EGF の性質を考慮すると、膜結合型 HB-EGF の切断を抑えて分泌型を生じないようにしても、HB-EGF 過剰発現による副作用を抑えられないことも考えられる。さらに、目的の細胞へ発現させた膜結合型ヒト HB-EGF が切断されて分泌型となると、ヒト HB-EGF の DT 受容体としての活性が失われることや、血液中に遊離した分泌型ヒト HB-EGF が DT との結合において競合することにより、目的の細胞を破壊できなくなる可能性が挙げられる。

そこで、DT 受容体機能を保持しつつ増殖因子活性を失い、プロテアーゼによる切断が起こらない変異型ヒト HB-EGF を作製することで、TRECK 法の改良を行った。

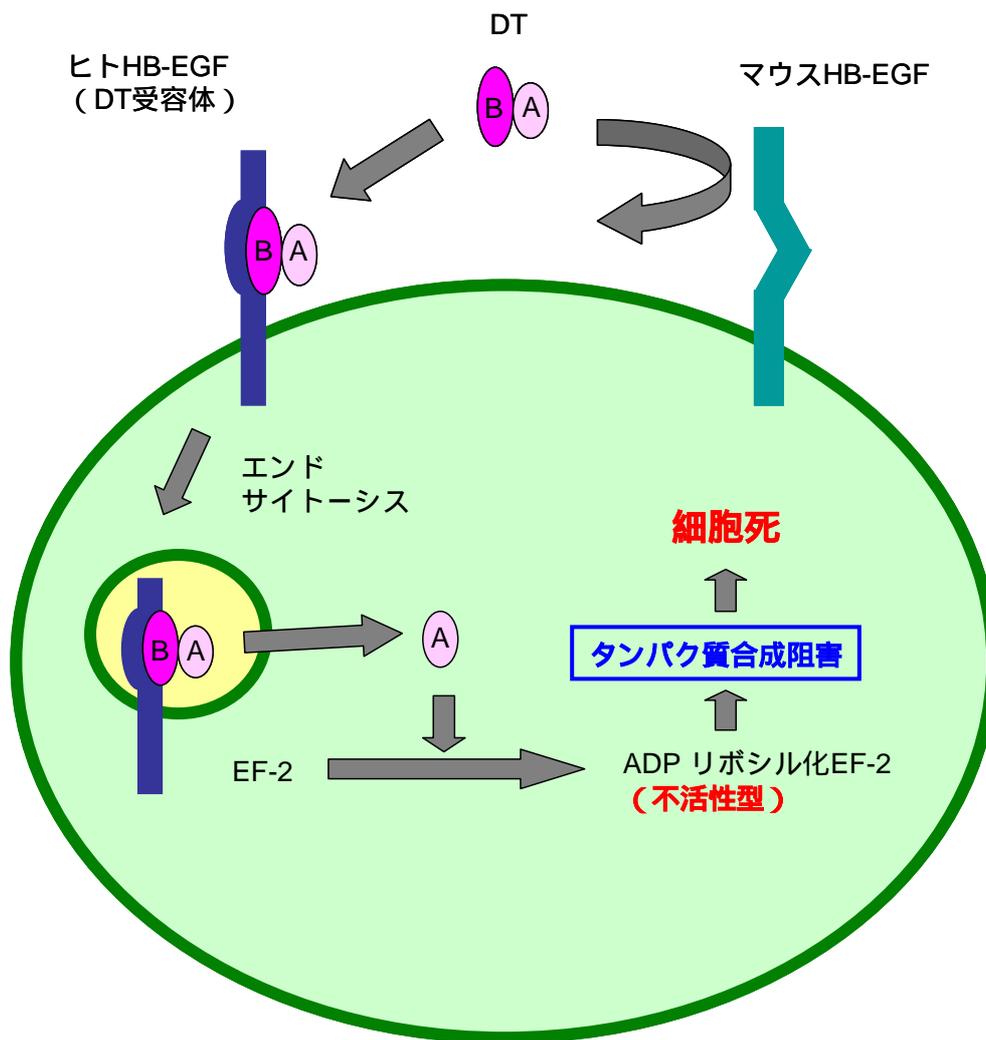


図 1-1 DT の作用機序

ジフテリア毒素 (DT) は, A と B の 2 つのフラグメントから構成され, B フラグメントを介して細胞表面にある Heparin-Binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) と結合することによって細胞内に取り込まれる。その後, A フラグメントがサイトゾルへ移行し, ペプチド鎖伸長因子 2 (EF-2) を ADP リボシル化し不活性化することでタンパク質合成を阻害し, 細胞を死に至らしめる。A フラグメントは, サイトゾルに 1 分子存在するだけで, すべての真核生物の細胞を死に至らしめる活性をもつが, DT に対する感受性は動物種間によって異なり, ヒト由来の細胞は DT に対して感受性が高いが, マウス由来の細胞は極めて低いことが知られている。この感受性の違いは, DT 受容体として働く HB-EGF のアミノ酸配列がヒトとマウスで異なり, ヒト HB-EGF には DT が結合するが, マウス HB-EGF には DT が結合しないことによって生じている。

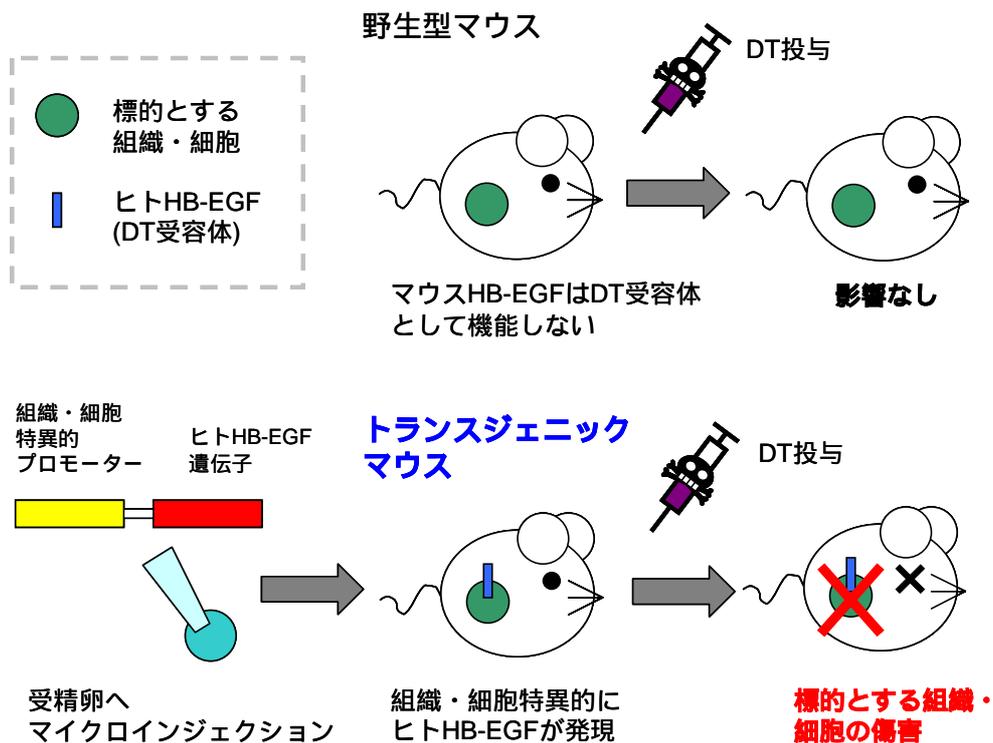


図 1-2 TRECK 法の概要

マウス HB-EGF は DT 受容体として機能しないので、野生型マウスに DT を投与しても影響は見られない。この性質に着目して、ヒト HB-EGF 遺伝子を特定の組織や細胞特異的に発現させるプロモーターにつなげてマウスの受精卵に導入すると、その組織や細胞のみでヒト HB-EGF を発現するトランスジェニックマウスが得られる。そして任意の時期にその個体へ DT を投与することで、ヒト HB-EGF を発現した細胞のみに障害を与えることが可能となる。この TRECK 法を用いて、マウス生体内で肝細胞特異的に細胞死を起こさせることに成功している。( Saito et. al., 2001 )

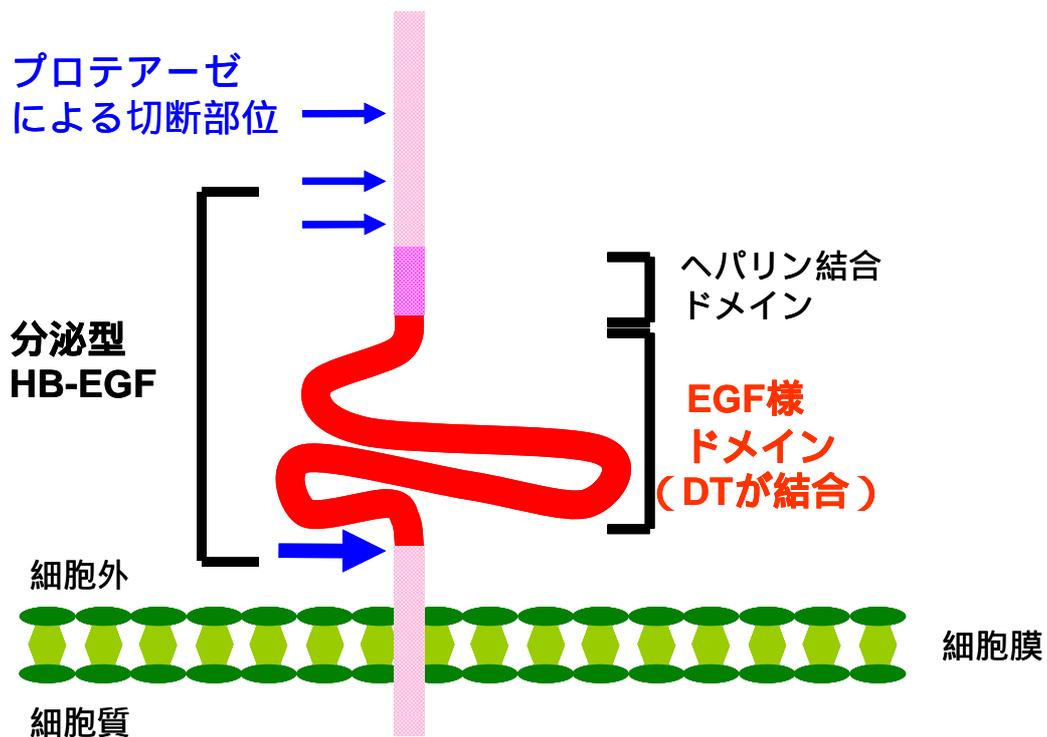


図 1-3 HB-EGF の構造

HB-EGF は、EGF ファミリーに属する増殖因子で、EGF-like ドメインを持つ膜結合型のタンパク質として合成された後、プロテアーゼにより細胞外領域が切断され分泌型となり血液中に遊離する。そして EGF 受容体に結合してリン酸化の刺激となる。また DT は HB-EGF の EGF-like ドメインに結合する。しかし、分泌型となったヒト HB-EGF は DT 受容体として機能しない。膜結合型ヒト HB-EGF の主要な切断部位である Leu<sup>148</sup> の位置を太矢印で示した。

## 材料と方法

### 細胞, WEHI-3 培養上清, ジフテリア毒素 (DT) およびマウス

NIH 3T3 細胞, Hela 細胞 (Hela tet off cells, Clontech) および外来遺伝子を導入したこれらの細胞は, 10% Foetal bovine serum (FBS, Thermo Trace, オーストラリアなど) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma; D6546) 培地で培養した。PLAT-E 細胞 (東京大学医科学研究所, 北村俊雄博士より供与, Morita et al., 2000) は, 10% FBS, 1 $\mu$ g/ml ピューロマイシン (Sigma; P-8833), 10 $\mu$ g/ml プラストシチジン (Invitrogen; R210-01), 100 単位/ml ペニシリン (明治製菓) と 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (明治製菓) を添加した DMEM 培地で培養した。DER 細胞 (大阪大学微生物病研究所, 目加田英輔博士より供与) は, 10% FBS と IL-3 の供給源として 5% WEHI-3 培養上清を添加した RPMI 1640 培地 (Sigma; R8758) で培養した。WEHI-3 細胞 (大阪大学微生物病研究所, 目加田英輔博士より供与) は, 10% FBS を添加した DMEM 培地で培養し, 継代の時は浮いた細胞を捨て, 接着した細胞をトリプシンで剥がして回収した。細胞の培養はすべて, インキュベーター (37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>) の中で行い, 通常継代には, Cell Culture Dish (CORNING; 430167), DER 細胞のみ Suspension Culture Dish (CORNING; 430591) を用いた。

WEHI-3 培養上清は WEHI-3 細胞をコンフルエントの 1/10 で継代して 5 日間培養した培養上清を回収し, 遠心して沈殿物を取り除いた上清を用いた (Ihle et al., 1982)。

DT はジフテリア菌 (PW8 株) の培養上清より精製されたものを用いた (Ishii-Kanei et al., 1979, 岩脇修士論文 1997)。

マウスは日本クレアから購入し, 特に表記がなければ, C57BL/6J 系統の Adult マウス (8-24 週齢) を実験に使用した。

### プラスミド・コンストラクション

ヒト HB-EGF のアミノ酸残基を置換するための変異はすべて polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた部位特異的変異導入法により導入した。プラスミド・コンストラクションのための PCR に使用したプライマーのリストを表 1-1 に示した。本研究で作製したプラスミドのうち, 代表的なプラスミド 4 種類のマップを図 1-4 に示した。大腸菌はすべて, DH5 $\alpha$  を使用した。

ヒト HB-EGF 遺伝子をレトロウイルスベクターへ挿入したプラスミド (図 1-4A, NAIST 河野研ストック No.633 ほか) は, P1-BamHI と P2-EcoRI のプライマーを用いて pRcHBEGF (大阪大学微生物病研究所, 目加田英輔博士より供与,

Iwamoto et al., 1994, NAIST 河野研ストック No.38) に挿入されたヒト HB-EGF 遺伝子に *Bam* HI と *Eco* RI の制限酵素部位を付加して得られた断片 ,および PCR 法を用いた部位特異的変異導入法によって得られた変異型ヒト HB-EGF 遺伝子断片を , レトロウイルスベクターである pMX-IRES-GFP または pMXs-IG ( 東京大学医科学研究所 , 北村俊雄博士より供与 , Nosaka., 1999 , NAIST 河野研ストック No.529 または 564 ) の *Bam* HI と *Eco* RI の制限酵素部位へ挿入して作製した。図 1-15 と 16 で使用した強制分泌型ヒト HB-EGF をレトロウイルスベクターに挿入したプラスミドは , P1-*Bam*HI と wt-term , L148S-term または L148S/P149T-term のプライマーを用いて , *Bam* HI と *Eco* RI の制限酵素部位を付加して得られた断片を , pMXs-IG の *Bam* HI と *Eco* RI の制限酵素部位へ挿入して作製した。図 1-25 で使用した hemagglutinin( HA )タグを付加したヒト HB-EGF 発現プラスミド ( NAIST 河野研ストック No.799 ほか ) は , P1-*Bam*HI と P2-HA-*Eco*RI のプライマーを用いて *Bam* HI と *Eco* RI の制限酵素部位を付加して得られた断片を , pMXs-IG の *Bam* HI と *Eco* RI の制限酵素部位へ挿入して作製した。

肝炎モデルマウス作製用 pAlbTR2 プラスミド ( 図 1-4B , NAIST 河野研ストック No.670 ) は , P1-*Eco*RI と P2-*Eco*RI のプライマーを用いて *Eco* RI の制限酵素部位を付加して得られた断片を , pBstN [ 本学動物分子工学 ( 当時 ) , 小林和人博士より供与 , NAIST 河野研ストック No.55 ] の *Eco* RI の制限酵素部位へ挿入したプラスミド ( pTRECK2 , NAIST 河野研ストック No.669 ) へ , p2335A-1 ( 大阪大学細胞工学センター , 金田安史博士より供与 , NAIST 河野研ストック No.36 ) から *Not* I と *Bam* HI で切り出したアルブミンエンハンサー・プロモーターの断片を挿入して作製した。野生型ヒト HB-EGF を発現する肝炎モデルトランスジェニックマウス作製には , pMS7 ( Saito et al., 2001 , 齊藤博士論文 2005 , NAIST 河野研ストック No.206 ) を使用した。

図 1-24 で使用した強制分泌型ヒト HB-EGF 発現プラスミド ( 図 1-4C , NAIST 河野研ストック No.908-916 ) は , P1-*Eco*RI と P2-148t-*Eco*RI または P2-L148Vt-*Eco*RI のプライマーを用いて , *Eco* RI の制限酵素部位を付加して得られた断片を , 哺乳類発現ベクターである pCAGGS ( Niwa et al., 1991 , NAIST 河野研ストック No.81 ) の *Eco* RI の制限酵素部位へ挿入して作製した。

ヒト HB-EGF 全身発現マウス作製用プラスミド ( 図 1-4D , NAIST 河野研ストック No.919-921 ) は , 次の通りに作製した。まず図 1-27 で使用した GFP 融合型ヒト HB-EGF 遺伝子をレトロウイルスベクターで発現させるプラスミド ( 古川修士論文 2003 ) を作製した。PCR 法により P1-*Eco*RI と P2-*Age*I のプライマーを用いて , pRcHBEGF に挿入されたヒト HB-EGF 遺伝子に *Eco* RI と *Age* I の制限酵素部位を付加した断片を , pEGFP-N1 ( Clontech-TaKaRa , NAIST 河野研スト

ック No.122) の *Eco* RI と *Age* I の制限酵素部位に挿入して得られたプラスミドから *Eco* RI と *Not* I で切り出して、レトロウイルスベクターである pMXs-neo( 東京大学医科学研究所, 北村俊雄博士より供与, NAIST 河野研ストック No.563 ) の *Eco* RI と *Not* I の制限酵素部位に挿入した ( pMXs-HBEGF-GFP, NAIST 河野研ストック No.635 )。このプラスミドから, P1-*Eco*RI と P2-EGFP-*Eco*RI のプライマーを用いて, *Eco* RI の制限酵素部位を付加した断片を, pCAGGS の *Eco* RI の制限酵素部位へ挿入して, 図 1-4D のプラスミドを作製した。

#### PCR 法を用いた部位特異的変異導入法

プラスミド・コンストラクションのための PCR はすべて, 表 1-1 に並べた 4 種類 ( P1, P2, M1, M2 ) に分類したプライマー ( 以下ではそれぞれ, P1 プライマー, P2 プライマー, M1 プライマー, M2 プライマーと表記 ) を用いて行った。制限酵素部位の付加は, P1 プライマーと P2 プライマーの組み合わせで, (1) 98 1 分, (2) 98 10 秒, 65 30 秒, 72 1-2 分を 30 サイクル (3) 72 10 秒, 4 保存の条件で, Pyrobest DNA polymerase ( TaKaRa ; R005B ) を 50 $\mu$ l の反応系で 0.2 $\mu$ l ずつ用いて PCR 反応を行った。また, 部位特異的変異導入は, P1 プライマーと M2 プライマー, P2 プライマーと M1 プライマーの組み合わせで, それぞれ同様の条件で 1 回目の PCR 反応を行った後, 生成した 2 種類の断片を混ぜた溶液を鋳型として, P1 プライマーと P2 プライマーの組み合わせで, 同様の条件で 2 回目の PCR 反応を行い, 生成した DNA 断片を電気泳動により分離した後に切り出し, DNA 回収用ガラスパウダー ( EASYTRAP<sup>TM</sup> Ver.2, TaKaRa ; 9410 ) を用いて精製した。2 箇所のアミノ酸置換を行った変異型ヒト HB-EGF は, 同様の PCR を繰り返すことで変異を導入した。すべての作製したプラスミドは, DNA シークエンサー ( ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, アプライドバイオシステムズ ) を使用して配列を確認した。

#### レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法

パッケージング細胞の PLAT-E 細胞を 6.0 cm dish ( CORNING ; 430166 ) に  $2.0 \times 10^6$  個となるように調整し 12-18 時間培養した後, 9 $\mu$ l の FuGENE6 Transfection Reagent ( Roche ; 1814 443 ) と 3 $\mu$ g のプラスミドの混合液を滴下して 24 時間培養し, 3-4ml の新しい培地に交換した。さらに, 24 時間培養した後, 培養上清を回収してウイルス溶液とした。そして, NIH 3T3 細胞を 10 cm dish ( CORNING ; 430167 ) に  $2.0 \times 10^5$  個ずつ調整し 12-18 時間培養した後, ウイルス溶液を 5ml とポリブレン ( hexadimethrine bromide, Sigma ; H9268-5G ) を 8 $\mu$ g/ml となるように加えた新しい培地中で培養した。続けて細胞を新しい 10 cm dish に調整し, 同様にウイルス溶液中で培養し, 遺伝子を導入した。その概要を図 1-5 に示した。

遺伝子を導入した細胞は 2 回目の感染から 2-3 回継代した後に実験に使用した。

#### リン酸カルシウム法による遺伝子導入法

Hela 細胞への遺伝子導入は、リン酸カルシウム法により行った。Hela 細胞を、10 cm dish (CORNING ; 430167) に  $1.0 \times 10^6$  個となるように調整し 12-18 時間培養した後、プラスミド DNA 20 $\mu$ g を 50 $\mu$ l の TE (pH 8.0) に溶解後、2.5M CaCl<sub>2</sub> 50 $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 400 $\mu$ l を加え、この溶液を pH 7.10 の 2 $\times$ HBS (50mM HEPES、280mM NaCl、1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O) 500 $\mu$ l に滴下懸濁し、室温で正確に 20 分間静置した。その後、このプラスミド混合液を全量 dish に滴下し 6 時間培養し、Hank's 溶液 (130mM NaCl、5.3mM KCl、5.5mM Glucose、3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、10mM HEPES、0.005N NaOH、0.5 $\times$ 10<sup>-3</sup>% Phenol red、1 $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>、1 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>) で 2 回洗浄後、新しい培地に交換し培養を続けた。6.0 cm dish (CORNING ; 430166) への遺伝子導入は (図 1-23)、調整する細胞数や dish に滴下するプラスミド混合液の量をすべて半分にして行った。

#### 膜結合型 HB-EGF の切断確認

回収時にコンフルエントの 70-80%程度となるように、細胞を 10 cm dish (CORNING ; 430167) に調整し、無血清培地で 18 時間培養後、64nM TPA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate、ナカライテスク ; GR27547-14、全量を DMSO へ溶かし -30 保存、再凍結不可) や 10% FBS を培地中に加えさらに 30 分間培養し、細胞からタンパク質を回収し、Western Blot により、膜結合型 HB-EGF の切断を確認した。

#### 細胞からタンパク質の回収

細胞を培養した dish から培地を取り除き、冷えた PBS (-) で 2 回洗浄した後、Lysis Buffer [ 10mM Tris-HCl (pH 7.4)、1% NP-40、1mM EDTA、2 $\mu$ g/ml アプロチニン (製造中止) またはベンズアミジン (ナカライテスク ; 040-36)、2 $\mu$ g/ml ロイペプチン (ペプチド研究所 ; 4041)、1 $\mu$ g/ml ペプスタチン (ペプチド研究所 ; 4397)、100 $\mu$ g/ml PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride、ナカライテスク ; 273-27) in PBS ] を 0.6-1ml 加え、4 で 10-20 分間培養した後、スクレイパーで細胞をはがして集め、13,500rpm で 2 分間遠心して上清を回収した。そして、BCA 法 (PIERCE) を用いてタンパク質量を行った後、Western Blot に用いた。

#### Western Blot

Total Protein 10 $\mu$ g を 12%アクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロースフィルター (9 cm $\times$ 8 cm、Schleicher & Schuell ; 10401196) に 72mA で 90 分間ブ

ロットし,10%スキムミルク/PBS でブロッキングを行った。そして1次抗体と2次抗体とを反応させた後, ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare; RPN2106) で発色させ, ルミノイメージアナライザー (FUJIFILM) を用いて測定, または X 線フィルム (FUJIFILM) に感光した。HB-EGF の N 末の検出は, EGF 様ドメインを認識する Anti-human HB-EGF Antibody (R&D SYSTEMS; AF-259-NA, 1mg/ml in PBS のストック液を 1:1000 で使用, 反応は必ず一晩) を, GFP の検出は,  $\alpha$ -GFP antibody (Clontech; 8367-1, 1:1000 で使用) を, HA タグの検出は, マウスモノクローナル抗体(12CA5, Roche; 1 666 606, 1:1000 で使用) を 1 次抗体として用い, それぞれ, horseradish peroxidase (HRP) が結合した Anti-goat IgG (Jackson; 705-035-147, 1:20000 で使用), Anti-Rabbit IgG (Amersham Biosciences; NA 934, 1:2000 で使用), Anti-mouse IgG (DAKO; P0447, 1:1000 で使用) を 2 次抗体として用いて行った。

#### 培養細胞の DT 感受性測定

24 ウェルプレート (CORNING; 3526) に培養細胞を調製し [ NIH 3T3 細胞 (図 1-22):  $2.0 \times 10^4$  個 ] 18-24 時間培養した後, 終濃度が  $0, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}, 1, 10 \mu\text{g/ml}$  となるように DT を加えて培養 (図 1-22: 12 時間) し, 培養溶液を取り除いた後,  $^{35}\text{S}$  ラベル化 Met/Cys 溶液 ( $5 \mu\text{Ci/ml}$ , EXPRESS protein labeling mix, Perkin Elmer), 10% FBS と通常の DMEM 培地を 10% 添加した Met/Cys 不含の DMEM 培地 (GIBCO-Invitrogen; 21013-024) を加え, 1 時間培養した。その後 PBS で洗浄し, 細胞を 0.1N NaOH で溶解し, 10% トリクロロ酢酸を加え, 4 で 30 分以上静置した後, 生成した沈殿物を 10 穴吸引式 glass filter フォルダールを用いて 25mm glass filter (Whatman; 1822-025) に吸着させ, その放射活性を液体シンチレーションカウンター (BECKMAN) で測定した。図 1-13 では, 24 ウェルプレートに培養細胞を調製し 18-24 時間培養した後, 無血清培地に交換し, 終濃度が 64nM となるように TPA (【膜結合型 HB-EGF の切断確認】の項を参照) を加えて 30 分間培養した後, DT を加えて培養した。DT 投与時間終了 30 分前に,  $^{35}\text{S}$  ラベル化 Met/Cys 溶液を加えて取り込ませ, PBS で洗浄後同様の操作を行った。

#### 共培養によるヒト HB-EGF の増殖活性測定

ヒト HB-EGF を発現した細胞を, 特に表記がなければ, 6 ウェルプレート (CORNING; 3516) に  $2.0 \times 10^4$  個ずつまたは, 12 ウェルプレートに  $1.0 \times 10^4$  個ずつ調整し 24 時間培養後 RPMI1640 培地で洗浄し, DER 細胞を各ウェルに  $2.0 \times 10^5$  個ずつ (または  $1.0 \times 10^5$  個ずつ/12 ウェルプレート) 加えて, 10% FBS を添加した RPMI1640 培地中で 36 時間培養した。WEHI-3 培養上清は 5% となるように加えた。その後, 各ウェルの DER 細胞をピペティングして 96 ウェル

プレート (CORNING ; 3595) へ移し , DNA 合成量または生細胞数を測定した。

#### 分泌型ヒト HB-EGF の増殖因子活性測定

分泌型ヒト HB-EGF を産出させるために ,Hela 細胞を 6.0 cm dish( CORNING ; 430166 ) に  $5.0 \times 10^5$  個となるように調整し 12-18 時間培養した後 , ヒト HB-EGF 遺伝子 ( 1 から 148 番目までのアミノ酸残基 ) を含むプラスミド  $10 \mu\text{g}$  をリン酸カルシウム法により導入した。24 時間培養後 4ml の新しい培地に交換し , さらに 24 時間培養した。そして培養上清を回収して , 培養上清中のヒト HB-EGF の量を Western Blot により見積もった。

次に増殖因子活性を測定するために , サンプル中の分泌型ヒト HB-EGF の量を培地で希釈してそろえ , DER 細胞を 96 ウェルプレート ( CORNING ; 3595 ) に  $1.0 \times 10^4$  個となるように調整した。そして , 分泌型ヒト HB-EGF を含むサンプルを各ウェルへ加えて 36 時間培養した後 , DER 細胞の細胞数を測定した。

#### 膜結合型ヒト HB-EGF の増殖因子活性測定

ヒト HB-EGF を発現した細胞を , 特に表記がなければ , 6 ウェルプレート ( CORNING ; 3516 ) に  $2.0 \times 10^4$  個ずつまたは , 12 ウェルプレート ( CORNING ; 3513 ) に  $1.0 \times 10^4$  個ずつ調整し 24 時間培養後 , 細胞表面のヘパリン硫酸プロテオグリカンにトラップされた分泌型 HB-EGF を除くために , 2M NaCl を含む RPMI1640 培地で洗浄し ( Higashiyama et al., 1995 ) , 10%ホルムアルデヒド/PBS を加えて 10-15 分間静置して固定した。そして , RPMI1640 培地で 5 回洗浄し ( このうち 1 回は培地を加えて 30 分以上静置 ) , DER 細胞を各ウェルに  $2.0 \times 10^5$  個ずつ ( または  $1.0 \times 10^5$  個ずつ / 12 ウェルプレート ) 加えて , 10% FBS を添加した RPMI1640 培地中で 36 時間培養した。その後 , 各ウェルの DER 細胞をピッペティングして 96 ウェルプレート ( CORNING ; 3595 ) へ移し , DNA 合成量または生細胞数を測定した。

#### DNA 合成量の測定

$^3\text{H}$  ラベル化チミジン溶液 (  $74\text{kBq/ml}$  , Amersham Biosciences ; TRK120 ) を  $10 \mu\text{l}$  ずつ加えて 4 時間取り込ませ , セルハーベスター ( SKATRON ) を用いてサンプルをガラスフィルターマット ( Wallac ) へ吸着させた。そして , その放射活性を多検出シンチレーションカウンターの MicroBeta ( Pharmacia Biotech ) で測定した。

#### 生細胞数の測定

生細胞数測定試薬 SR ( ナカライテスク ) を  $10 \mu\text{l}$  ずつ加えて 3 時間培養した後 ,

1% SDS で反応を停止させ ,マイクロタイタープレート( Bio Rad )を用いて 450nm の吸光度を測定した。

### トランスジェニックマウスの作製

肝炎モデルトランスジェニックマウス , Alb-TR1 は pMS7 プラスミド ( Saito et al., 2001 ; 齊藤博士論文 2005 ) より , Alb-TR2 は pAlbTR2 プラスミド ( 図 1-4B ) より , *Not I* と *Xho I* で処理してできた断片を切り出し , QIAquick gel extraction kit ( Qiagen ) を用いて精製されたものをトランスジーンとして利用した。ヒト HB-EGF 全身発現トランスジェニックマウス ( CAGTR1/GFP , CAGTR5/GFP と CAGTR6/GFP ) は , pCAGTR1-GFP プラスミド ( 図 1-4D ) またはこれと同様のコンストラクトを行ったプラスミド ( pCAGTR5-GFP , pCAGTR6-GFP ) より , *Sal I* と *Hin dIII* で処理してできた断片から精製されたものをトランスジーンとして利用した。これらのトランスジーンを , C57BL/6J×C57BL/6J から得られた受精卵にマイクロインジェクションし , レシピエントマウス ( ICR ) の卵管に移植しトランスジェニックマウスを得た。トランスジェニックマウスの作製は , 齊藤美知子博士または高橋一彰氏に依頼した。作製方法の詳細は , 齊藤博士論文 2005 を参照。

### マウスゲノム DNA の回収

マウスの尻尾をハサミで 5mm 程切除し , Lysis Buffer [ 50mM Tris-HCl ( pH8.0 ) , 0.1M NaCl , 20mM EDTA , 1% SDS , 150µg/ml Proteinase K ] を 1ml 加えて一晩 , 55 ° でゆっくり回転させながら溶解した。その後 , フェノール/クロロホルム抽出を行い , 100%エタノールを加えて析出させ , チップで 70%エタノール溶液中に移し洗浄し , 適量の TE ( 20-30µl ) に溶解した。

### Southern Blot

【バイオ実験イラストレイテッド ( 秀潤社 ) 第 2 巻 , 第 8 章サザンハイブリダイゼーション】の方法に従った。

マウス尻尾から回収したゲノム DNA ( 5µg ) を *Eco RI* で消化し , 0.8%アガロースゲルで電気泳動した。EtBr で染色し , サテライトバンドによりゲノム DNA の完全消化を確認し , 0.25M HCl で加水分解処理と続けて 1.5M NaOH/0.5M NaCl で中和した、その後 , 0.4M NaOH を用いポジティブチャージのナイロンメンブレン ( Hybond N+ , Amersham Bioscience ; RPN303B ) にキャピラリー法にてアルカリトランスファーを行い 2×SSC でメンブレンを洗浄し 80 ° で 2 時間 baking 処理することでメンブレンへ DNA を固定した。

ハイブリダイゼーションとメンブレンの洗浄には , チャーチリン酸バッファ

ー [ 0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( pH7.2 ) ] を使用した。ハイブリダイゼーションバッファー ( 0.5M チャーチリン酸バッファー、1mM EDTA , 7% SDS ) で 65 °C , 5 分以上ブレハイブリダイゼーションした後 , [α-<sup>32</sup>P]dCTP と Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2( TaKaRa ; 6045 ) を用いて標識した cDNA 断片をプローブとして , 65 °C で一晩ハイブリダイゼーションした。メンブレンの洗浄は , 洗浄液 ( 40mM チャーチリン酸バッファー , 1% SDS ) で 65 °C , 5 分間洗浄を 3 回繰り返し , 最後に 15 分間洗浄した。さらに , 0.1% SSC/0.1% SDS で 65 °C , 5 分間洗浄し , BAS 2500 system ( Fuji Film ) で 3 時間以上露光させシグナルを検出した。

ヒト HB-EGF のプローブは , pRcHBEGF のプラスミドを *Hind* III と *Xba* I で処理し , DNA 回収用ガラスパウダー ( EASYTRAP<sup>TM</sup> Ver.2 , TaKaRa ; 9410 ) を用いて回収した断片を鋳型として利用した。

#### PCR 法による genotyping

4-6 週齢のマウス尻尾から回収したゲノム DNA を鋳型として , rTaq( TaKaRa ; R001 ) を 25μl の反応系で 0.15μl ずつ用いて PCR を行った。Alb-TR1 と Alb-TR2 のトランスジェニックマウスは , HBEGF550F と AlbTR2103R のプライマーを用いて , (1) 94 °C 5 分 , (2) 94 °C 1 分 , 58 °C 1 分 , 72 °C 1 分を 35 サイクル (3) 72 °C 5 分 , 4 °C 保存の条件で , CAGTR1/GFP , CAGTR5/GFP と CAGTR6/GFP のトランスジェニックマウスは , HBEGF550F と CAG-のプライマーを用いて , (1) 94 °C 5 分 , (2) 94 °C 1 分 , 60 °C 1 分 , 72 °C 1 分を 30 サイクル (3) 72 °C 5 分 , 4 °C 保存の条件で , genotyping を行った。ここで用いたプライマーの配列を以下に示す。

HBEGF550F : 5'- CTT CTC ATG TTT AGG TAC CA -3'

AlbTR2103R : 5'- CTG ATG ACC TCT TTA TAG CC -3'

CAG- : 5'- AAG GGG CTT CAT GAT GTC CC -3'

#### マウス組織から RNA の回収

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ各組織を摘出し , 直ちに液体窒素で凍らせた。そして , ISOGEN ( ニッポンジーン ; 311-02501 ) を 600μl と 5mm ガラスビーズを加えて , 多検体細胞破碎装置 ( TissueLyser , QIAGEN ) を用いて破碎し ( 25 回転 3 分 ) , ISOGEN を 350μl 追加してから添付プロトコールに従って Total RNA を抽出した。

#### Northern Blot

Total RNA 10μg をホルマリン変性ゲルにて電気泳動後 , ナイロンメンブレン ( Hybond-N , Amersham Bioscience ; RPN303N ) に , 20×SSC を用いてキャピラリー法にて転写し , 2×SSC で洗浄し , 80 °C で 2 時間 Baking 処理をすることで

RNA を固定した。ハイブリダイゼーション，メンブレンの洗浄は Southern Blot と同様の方法で行った。マウス GAPDH のプローブは，pKS-mGAPDH( NIH 3T3 細胞から得られた cDNA を挿入したプラスミド，NAIST 河野研ストック No.663 ) を *Eco* RI で処理して得られた cDNA 断片 ( 約 1kb ) を鋳型として用いて作製した。

#### マウス個体への DT 腹腔内投与

DT ( ストック ; 6mg/ml ) を PBS にて，1 回の投与量が 200 $\mu$ l 前後となるように適当な濃度に希釈し，腹腔内へ注射した。

#### 血液中 GPT 活性の測定

マウス尻尾より採血を行い ( ~100 $\mu$ l 程度 )，5,000rpm で 2-5 分間遠心して血清を得た。そして，GOT/GPT 活性測定キット ( トランスアミナーゼ測定用 トランスアミナーゼ CII-テストワコー，和光純薬 ; 431-30901 ) を添付文書の標準操作法 2 の 1/4 の反応系で用いて，血清中の GPT 活性を測定した。赤血球中には血清中の約 40 倍の GOT が含まれており，測定値に誤差を生じやすいため，GPT のみを肝障害の指標とした。

#### 初代培養肝細胞の調整

マウスをトリプロモエタノールにて麻酔し，腹部を切開して下大静脈を露出させ，下大静脈に 24G サーフロー留置針をカニューレーションし糸で固定した。横隔膜を切開し横隔膜上で下大静脈を結紮，あらかじめ 37 に温めておいた Hanks [ HANKS ' BALANCED SALTS ( Sigma ; H-4891 ) 100mg，10mM Hepes，4mM NaHCO<sub>3</sub>，0.5mM GEDTA ( Dojin ; 346-01312 ) ] を用いて灌流を開始し，直ちに門脈を切断し脱血を行った。肝臓の脱血が完全に行われた後，コラゲナーゼ溶液 [ 0.05% Collagenase Type2 ( GIBCO-Invitrogen ; 17101-015 )，0.8% NaCl，5.4mM KCl，5mM CaCl<sub>2</sub>，5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，0.42mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，10mM Hepes，6 $\mu$ g/ml Phenol Red，4.2mM NaHCO<sub>3</sub>，0.005% Trypsin inhibitor ] で灌流を行った。約 10 分間 8-10ml/min. の速度で灌流し，肝皮膜下で肝実質が崩れていくことを確認して，肝臓を摘出した。DMEM 培地を加え，肝臓をはさみで mince した後，ガーゼでこして 100 $\mu$ m の篩を用いて filtration し，50ml のファルコンチューブへ移し，1,000rpm，4 で 5 分間遠心し，上清を取り除いた後，300rpm，4 で 1 分間遠心し上清を取り除く操作を 2 回繰り返す，培地に懸濁した。その一部を Trypan Blue ( GIBCO-Invitrogen ; 15250-061 ) で染めて，生細胞数を数えた。( 斉藤博士論文 2005 の図 1-13 を参照 )

### 初代培養肝細胞の DNA 合成量

コラゲナーゼ灌流法を用いて回収した肝実質細胞を、コラーゲン処理した 24 ウェルプレート (IWAKI ; 4810-020) に、図 1-12 で記載した細胞数となるように調整し、血清を含む培地 ( William's medium E , 100 µg/ml streptomycin , 100 U/ml penicillin , 10% FBS , 10 µg/ml insulin , 4 µg/ml dexamethasone ) で一晩 ( 12-14 時間 ) 培養後、無血清培地 ( William's medium E , 100 µg/ml streptomycin , 100 U/ml penicillin , 10 µg/ml insulin , 2 µg/ml aprotinin ) に交換し、5 時間培養した。そして <sup>3</sup>H ラベルチミジン溶液 ( 74kBq/ml , Amersham Biosciences ; TRK120 ) を加えてさらに 5 時間培養し、PBS で洗浄後、細胞を 0.1N NaOH で溶解し、10%トリクロロ酢酸を加えた。そして生成した沈殿物を glass filter ( Whatman ; 1822-025 ) に吸着させ、その放射活性を液体シンチレーションカウンター ( BECKMAN ) で測定した。

### 初代培養肝細胞の DT 感受性

コラゲナーゼ灌流法を用いて回収した肝実質細胞を、コラーゲン処理した 24 ウェルプレート (IWAKI ; 4810-020) に  $5.0 \times 10^4$  個ずつ調整し、血清を含む培地 (【初代培養肝細胞の DNA 合成量】の項と同じ) で一晩 (12-16 時間) 培養し、種々の濃度の DT を加え、以下、【培養細胞の DT 感受性測定】の項に記した方法と同様に測定した。

### マウス血液中 DT 濃度の測定

マウスに DT を投与し、1、2、4、7、24 時間後に採血し、血清を回収した。この血清の希釈溶液を Vero 細胞の培地中に加えて、タンパク質合成量が無添加時の 50%となる濃度 (EC<sub>50</sub>) を求め、既知の濃度の DT による EC<sub>50</sub> の値と比較することにより、血液中の DT 濃度を求めた。EC<sub>50</sub> を求めるために、24 ウェルプレート (CORNING ; 3526) に Vero 細胞を  $5.0 \times 10^4$  個となるように調整し 18-24 時間培養した後、その培養液中 (500µl) に、DT を終濃度が 0、 $10^{-3}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-1}$ 、1、10 ng/ml となるように、および希釈した血清を終濃度が 1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  %となるように 5µl ずつ加えて 6 時間培養し、培養溶液を取り除いた後、<sup>35</sup>S ラベル化 Met/Cys の Vero 細胞への取り込み量を、以下、【培養細胞の DT 感受性測定】の項に記載した方法と同様に測定した。

### マウス血液から RNA の回収

マウスの尾部から採血した血液 (約 125µl を 2-3 回) を H<sub>2</sub>O で 2 倍に希釈し、ISOGEN-LS (ニッポンジーン) を 750µl 加えて混ぜた後、メーカー添付プロトコールに従って RNA を回収した。血液約 125µl から 3-10µg 程度の RNA が回収

された。次に、3 $\mu$ l の DNaseI ( TaKaRa ; 2215 ) を含む 30 $\mu$ l の反応系で、Total RNA ( 5-15 $\mu$ g ) を室温で 20 分処理し、ISOGEN ( ニッポンジーン ) を 1ml 加えた。ISOGEN 添付プロトコールに従ってクロロホルム抽出を行った後に得られた水相へ、グリコーゲン ( ナカライテスク ; 17110-11 , 20mg/ml ) を 2 $\mu$ l と 3M NaOAc を 60 $\mu$ l 加えてからイソプロパノールを 600 $\mu$ l 加え、以下添付プロトコールに従って RNA の再抽出を行い、RT-PCR を行った。

### 血液由来 RNA の RT-PCR

RT-PCR は、メーカー添付プロトコールの半分の反応系で行った。ただし血液の中から回収する RNA 量が少ないため、逆転写酵素の量は半分にしなかった。

DNaseI 処理した Total RNA 2 $\mu$ l ( 1-2 $\mu$ g 程度 ) を鋳型として、0.5 $\mu$ l の 10mM dNTP mix、0.5 $\mu$ l の 0.5 $\mu$ g/ml Oligo(dT)、1 $\mu$ l の DEPC 水を加え、65 $^{\circ}$  で 5 分間処理を行った。氷上で 1 分間静置した後、さらに 1 $\mu$ l の 10 $\times$ RT Buffer、2 $\mu$ l の 25mM MgCl<sub>2</sub>、1 $\mu$ l の 0.1M DTT、0.5 $\mu$ l の RNase Out を加え 42 $^{\circ}$  で 1 分間処理を行った後、逆転写酵素である SuperScript II Reverse Transcriptase ( Invitrogen ; 18064-014 ) を 50 unit/ $\mu$ l に希釈し 1 $\mu$ l 加えた。この時、コントロールとして逆転写酵素を加えないサンプルも同時に調整した。42 $^{\circ}$  で 50 分間逆転写反応を行い、72 $^{\circ}$  で 15 分間処理を行った後、氷上で静置した。この反応液に Ribonuclease H ( RNase H , Invitrogen ; 18021-014 ) を 0.5 $\mu$ l 加えて 37 $^{\circ}$  で 20 分間処理したものを cDNA として使用した。

トランスジーンを検出には、HBEGF200F と GFP-R1 のプライマーを、 $\beta$ -アクチンの検出には b-actin-F と b-actin-R のプライマーを用いて、得られた cDNA を鋳型として PCR を行った。PCR は、( 1 ) 96 $^{\circ}$  5 分 ( 2 ) 96 $^{\circ}$  1 分、58 $^{\circ}$  1 分、72 $^{\circ}$  1 分、を 35 サイクル ( 3 ) 72 $^{\circ}$  10 分、4 $^{\circ}$  保存のプログラムで行い、rTaq ( TaKaRa ; R001 ) を 25 $\mu$ l の反応系で、トランスジーンを検出には 0.25 $\mu$ l、 $\beta$ -アクチンの検出には 0.15 $\mu$ l 使用した。ここで用いたプライマーの配列を以下に示す。

HBEGF200F : 5'- GTG ACT TGC AAG AGG CAG ATC T -3'

GFP-R1 : 5'- ACG GGC AGC TTG CCG GTG GT -3'

b-actin-F : 5'- ATG GAT GAC GAT ATC GCT G -3'

b-actin-R : 5'- ATG AGG TAG TCT GTC AGA T -3'

### マウス組織からタンパク質の回収

マウスより採取した組織片 ( 3-5mm 角 ) を冷えた PBS で満たした 48 ウェルプレート ( CORNING ; 3548 ) 中で 3 回軽く洗浄した後、Lysis Buffer ( 【細胞からタンパク質の回収】の項と同じ組成 ) を 0.6ml と 5mm ガラスビーズを含む 2ml

のエッペンチューブへ加え，多検体細胞破碎装置（TissueLyser，QIAGEN）を用いて破碎し（25 回転，3 分），13,500rpm で 2 分間遠心して上清を回収した。BCA 法（PIERCE）を用いてタンパク質定量を行った後，Western Blot に用いた。

#### 統計学的解析

トランスジェニックマウスが得られた割合の有意差の検定（表 1-4）は，フィッシャーの正確（直接）確率検定によって行い，その手順の 1 例を参考資料に記した。

試薬や機器名の直後の括弧内には，メーカー名とカタログ No. を次のように記した。（メーカー名；カタログ No.）

分類	名前	配列
P1	P1- <i>Bam</i> HI	5'- ACG GGATCC TCGAAAGTGA CTGGTGCCTCGCCGCCT -3'
	P1- <i>Eco</i> RI	5'- GAGCTC GAATTC TCGAAAGTGA CTGGTGCCTCGCCG -3'
P2	P2- <i>Eco</i> RI	5'- AGCGGC GAATTC TCAGTGGGAATTAGTCATGCCCAA -3'
	P2- <i>Age</i> I	5'- ACTGCA ACCGGT CC GTGGGAATTAGTCATGCCAACTT -3'
	wt-term	5'- CAGCTG GAATTC TCA TGGGAG GCTCAGCCCATGACACCT -3'
	L148S/P149T-ter m	5'- CAGCTG GAATTC TCA <u>GGTGCT</u> GCTCAGCCCATGACACCT -3'
	L148S-term	5'- CAGCTG GAATTC TCA TGGG <u>CT</u> GCTCAGCCCATGACACCT -3'
	P2-148t- <i>Eco</i> RI	5'- CAGCTG GAATTC TCAGAGGCTCAGCCCATGACA -3'
	P2-L148Vt- <i>Eco</i> RI	5'- CAGCTG GAATTC TCAC <u>AC</u> GCTCAGCCCATGACACCT -3'
	P2- HA- <i>Eco</i> RI	5'- CAG GAATTC TCA <b>AGATCCAGCGTAATCTGGAACATC GTATGGGTA</b> GTGGGAATTAGTCATGCCAACTT -3'
	P2-EGFP- <i>Eco</i> RI	5'- CAGCTG GAATTC TTA CTGTACAGCTCGTCCATGCC -3'
M1	I117A	5'- TACAAGGACTTCTGCG <u>CCC</u> ATGGAGAATGCAAA -3'
	I117V	5'- TACAAGGACTTCTGCG <u>TG</u> CATGGAGAATGCAAA-3'
	V124A	5'- GGAGAATGCAAATATG <u>CCA</u> AGGAGCTCCGGGCT -3'
	V124F	5'- GGAGAATGCAAATAT <u>TTCA</u> AGGAGCTCCGGGCT -3'
	V124L	5'- GGAGAATGCAAATAT <u>CTGA</u> AGGAGCTCCGGGCT -3'
	R128H	5'- TATGTGAAGGAGCTC <u>CA</u> CGCTCCCTCCTGCATC -3'
	R128K	5'- TATGTGAAGGAGCTC <u>AA</u> GGCTCCCTCCTGCATC -3'
	Y138D	5'- ATCTGCCACCCGGGT <u>GAC</u> CATGGAGAGAGGTGT -3'
	Y138L	5'- ATCTGCCACCCGGGT <u>CTG</u> CATGGAGAGAGGTGT -3'
	L148V	5'- TGTCATGGGCTGAGC <u>GTG</u> CCAGTGGA AAAATCGC -3'
	L148S/P149T	5'- TGTCATGGGCTGAGC <u>AGCAC</u> CGTGGA AAAATCGCTTA -3'
	M2	I117A
I117V		5'- TTTGCATTCTCCATG <u>CAC</u> GCAGAAGTCCTTGTA -3'
V124A		5'- AGCCCGGAGCTCCTT <u>GGC</u> ATATTTGCATTCTCC -3'
V124F		5'- AGCCCGGAGCTCCTT <u>GAA</u> ATATTTGCATTCTCC -3'
V124L		5'- AGCCCGGAGCTCCTT <u>CAG</u> ATATTTGCATTCTCC -3'
R128H		5'- GATGCAGGAGGGAGC <u>TGG</u> GAGCTCCTTCACATA -3'

R128K	5'- GATGCAGGAGGGAGC <u>CTT</u> GAGCTCCTTCACATA -3'
Y138D	5'- ACACCTCTCTCCATGGT <u>C</u> ACCCGGGTGGCAGAT -3'
Y138L	5'- ACACCTCTCTCCATGC <u>A</u> GACCCGGGTGGCAGAT -3'
L148V	5'- GCGATTTTCCACTGGC <u>A</u> CGCTCAGCCCATGACA -3'
L148S/P149T	5'- TAAGCGATTTTCCACGGT <u>G</u> CTGCTCAGCCCATGACA -3'

表 1-1 PCR プライマーの配列

プラスミド・コンストラクションのための PCR に使用したプライマーの配列を並べた。P1 と P2 に分類したプライマーは、制限酵素部位を付加するために使用し、M1 と M2 に分類したプライマーは、名前の欄に記した各変異型ヒト HB-EGF を得るために使用した。太字で示した配列は HA タグ、下線を引いた配列は変異を導入したアミノ酸残基をコードしていることを示す。

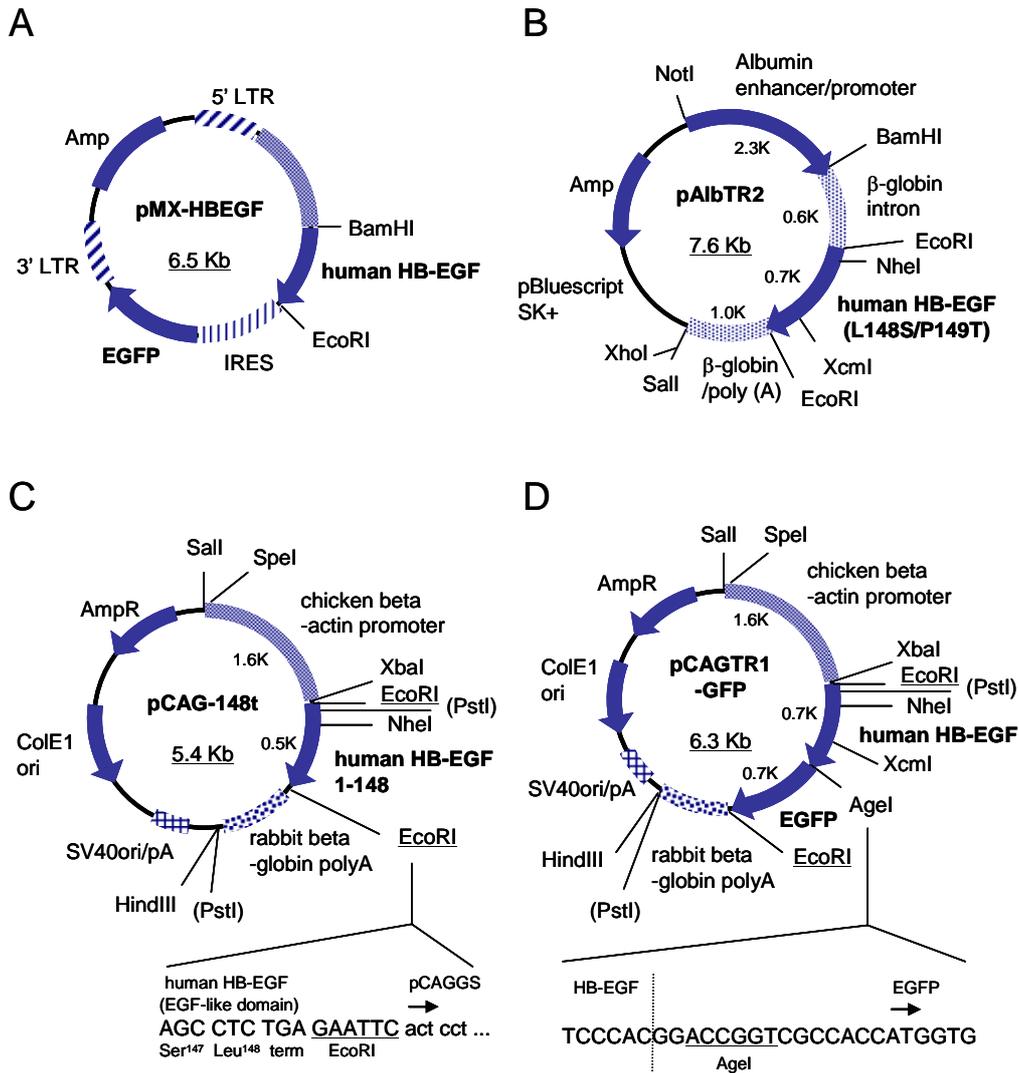


図 1-4 プラスミドマップ

- A. ヒト HB-EGF 遺伝子をレトロウイルスベクター (pMX-IRES-GFP) へ挿入したプラスミド。「」の部分は、レトロウイルスの構造遺伝子の一部を示す。
- B. 肝炎モデルトランスジェニックマウス作製用プラスミド。ヒト HB-EGF 遺伝子(この図では L148S/P149T 変異型)をアルブミンエンハンサー/プロモーターで発現させる。
- C. 強制分泌型ヒト HB-EGF 遺伝子を発現させるプラスミド。ここに示した pCAG-148t プラスミドは、図 1-24 の実験で使用した。
- D. ヒト HB-EGF 全身発現トランスジェニックマウス作製用プラスミド。ここでは野生型ヒト HB-EGF 遺伝子を持つ pCAGTR1-GFP プラスミドを示す。

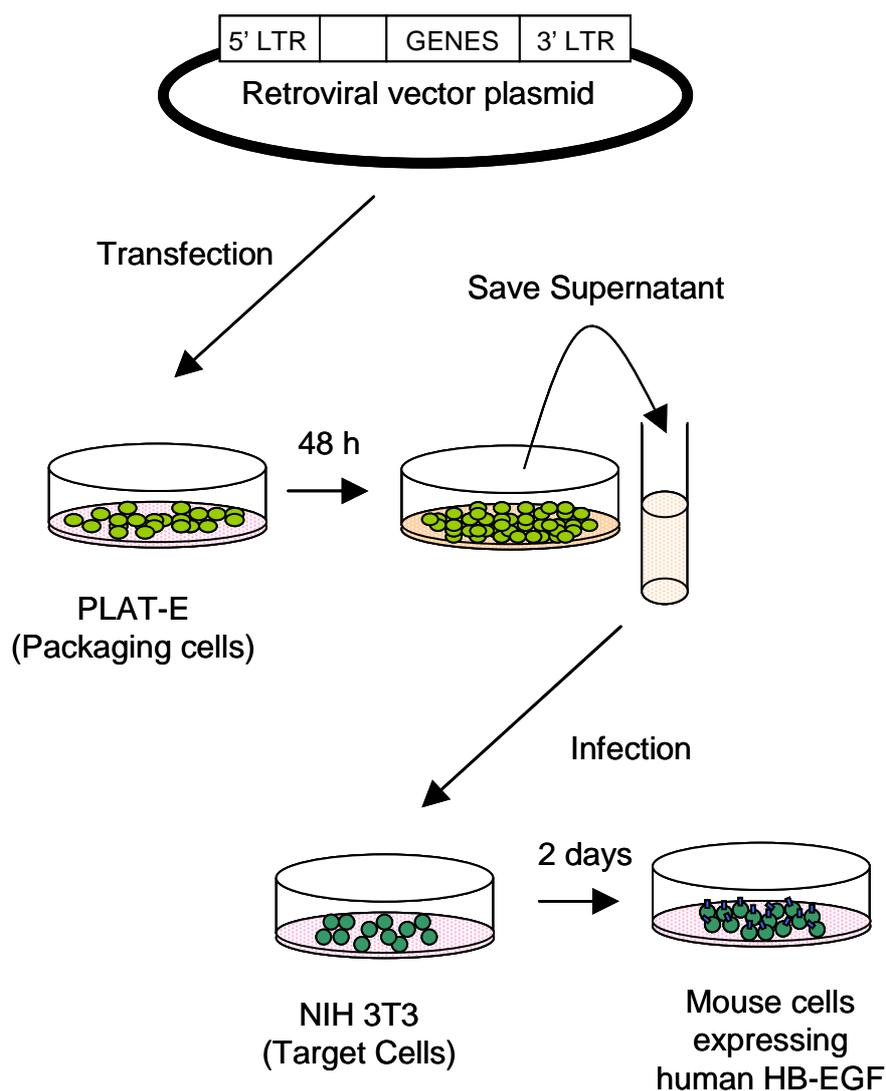


図 1-5 レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の概要

パッケージング細胞の PLAT-E 細胞へ、ヒト HB-EGF 遺伝子を挿入したレトロウイルスベクタープラスミドと Fugene6 トランスフェクション混合液を滴下して、48 時間後の培養上清をウイルス溶液として使用した。そしてウイルス溶液とポリブレンを加えた培地中で NIH 3T3 細胞を培養し、遺伝子を導入した。レトロウイルスベクタープラスミド中の「 」は、レトロウイルスの構造遺伝子の一部を示す。

## 結果

### 【1】非切断変異型 (L148S/P149T) ヒト HB-EGF の解析

#### (1-1) 肝炎モデルマウスを用いた解析

##### L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF

これまでに、148番目のロイシン (Leu<sup>148</sup>) が Ser に、または Pro<sup>149</sup> が Thr に変わったヒト HB-EGF (L148S または P149T) の膜結合型はそれぞれ、種々の刺激に対して切断されにくくなることが報告されている (Hirata et al., 2001)。そこで、これらの変異を組み合わせた L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF 遺伝子を作製し、解析を行った。まずレトロウイルスベクターを用いてマウス NIH 3T3 細胞へ導入し (図 1-5)、膜結合型の切断を Western Blot により調べた。膜結合型 HB-EGF の切断は、細胞培養に通常使用する FBS 中のリゾフォスファチジル酸 (LPD) によっても促進されるため (Hirata et al., 2001)、無血清培地中で 18 時間培養した後に膜結合型の切断 HB-EGF への切断刺激を加え細胞を回収した。その結果、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF 遺伝子を発現させた細胞では、膜結合型 HB-EGF の切断を促すことが知られている TPA 試薬や FBS を加えても、細胞抽出液中の膜結合型の切断がほとんど見られず、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF はプロテアーゼによる切断に耐性をもっていることが確認された。(図 1-6; 古川修士論文 2003)

##### L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF の増殖抑制効果

L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF は、膜結合型の切断がほとんど見られなかったことより、分泌型による増殖因子活性を無視できると考えられる。しかしこれまでに、膜結合型 HB-EGF には増殖を抑制する働きがあるという報告がある (Iwamoto et al., 1999)。この膜結合型 HB-EGF の性質を考慮すると、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF は、膜結合型がプロテアーゼにより切断されにくいことにより増殖抑制効果が野生型よりも高まっている可能性が考えられた。そこで L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF について、この増殖抑制効果を調べた (図 1-7)。

DER 細胞は、インターロイキン-3 (IL-3) 依存的に増殖する細胞であるため、EGF の代わりに十分な量の IL-3 を含む WEHI-3 培養上清を用いた。その結果、培地中に WEHI-3 培養上清が存在する条件下では、野生型ヒト HB-EGF を導入した細胞と共に培養した時の DER 細胞の DNA 合成量は、NIH 3T3 細胞と共に培養した時に比べ減少しており、野生型ヒト HB-EGF は増殖に対して抑制的に

働いたことが示された。一方、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF を導入した細胞では同様の増殖抑制効果は見られなかった (図 1-8)。

この結果は当初の予想とは反していたが、次のように解釈した。HB-EGF は、同じ EGF ファミリーに属する EGF などと同様に EGF 受容体に結合し活性化させる。そして L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF で変異を導入した 148 番目のロイシンは、ヒト EGF で 47 番目のロイシンに対応する。しかし、このヒト EGF の Leu<sup>47</sup> は EGF 受容体との結合活性に強く影響を与えるアミノ酸残基であり、マウス EGF の変異体の解析より、47 番目のロイシンをセリンへと置換した変異体の EGF 受容体との結合活性は、野生型の 14%にまで減少していたという報告がある (Campion et al., 1994)。このことより、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF の増殖抑制効果が見られなかったことは、Leu<sup>148</sup> への変異導入により EGF 受容体との結合活性も減少した結果であると考えた。つまり L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF は、プロテアーゼによる切断に耐性を持つだけでなく、EGF 受容体との結合活性も失っていると判断した。(古川修士論文 2003)

以上の結果より、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF は TRECK 法に用いる改良型毒素受容体として適していると考え、トランスジェニックマウス作製に用いて解析を続けた。

### トランスジェニックマウスの作製

肝実質細胞特異的に遺伝子を発現させるアルブミンエンハンサー/プロモーターの下流に、野生型または L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF 遺伝子を接続したトランスジーンを作製した。これらトランスジーンを C57BL/6J×C57BL/6J 受精卵へマイクロインジェクションして、誕生したマウスがトランスジーンを持っているかどうかを Southern Blot によって調べた。その結果、野生型ヒト HB-EGF 遺伝子を持つトランスジェニックマウス (Alb-TR1) は、9 匹 (6M2, 7F4, 7M2, 7M4, 7M5, 7M8, 7M10, 9M3 および 10F1) 得られた。また L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF 遺伝子を持つトランスジェニックマウス (Alb-TR2) は、7 匹 (1F6, 1F11, 1F12, 1M11, 2M3, 2M6 および 2M8) 得られた (図 1-9)。これらのマウスの解析結果の概要を表 1-2 にまとめた。

### トランスジーンの発現確認

それぞれのラインの F1 世代のマウスにおいて、PCR によりトランスジーンを保持していたことが確認された個体 (以下、Tg+と表記) の組織 (肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、胸腺、精巣、筋肉、脳) から RNA を回収し、ヒト HB-EGF 遺伝子の発現の有無を Northern Blot によって調べた。その結果、Alb-TR1 (Wild Type) の 2 ライン (6M2, 7M4) と Alb-TR2 (L148S/P149T) の 2 ライン (1F6, 1M11)

で、肝臓組織特異的にヒト HB-EGF の発現が確認された。一方、Alb-TR2 1F11 のラインでは肝臓の他、腎臓、心臓、筋肉、脳でもヒト HB-EGF の発現が強く見られ、以後の解析は行わなかった(図 1-10A)。調べたラインすべてにおいて筋肉と脳でもバンドが見られたが、このバンドは Tg-マウスから回収したサンプルでも見られ(図 1-10B)、位置が肝臓で見られるバンドの位置と若干異なっていたため、非特異的に見られるバンドであると判断した。

次に、肝臓におけるヒト HB-EGF の発現に、同じライン内で個体差が生じるかを調べるため、Alb-TR2 1M11 の Tg+マウス 5 匹の肝臓から RNA を回収し、ヒト HB-EGF 遺伝子の発現量を Northern Blot によって比べた。そしてマウス GAPDH の発現量で補正し、肝臓におけるヒト HB-EGF 遺伝子の発現比を求めた。その結果、ここで調べた 5 匹の間の発現比の差は最大で 1.4 倍であり(図 1-10C)、個体差は少ないと考えた。さらに、異なるライン間での肝臓ヒト HB-EGF の発現比を調べたところ、Alb-TR1 6M2 と Alb-TR2 1M11 で 2.0 倍の差があった(図 1-10D)。

#### DT 投与後の血液中 GPT 活性の比較

Alb-TR1 と Alb-TR2 のそれぞれで、早くライン化された Alb-TR1 6M2 と Alb-TR2 1M11 のマウスを用いて、DT 感受性の違いを比べた。肝臓でヒト HB-EGF を発現したマウスでは、DT 投与により肝臓に傷害を与えることができ、血液中の Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)、Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 活性が上昇する (Saito et al., 2001)。そこで、野生型マウス (Tg-) では影響を与えない濃度の DT を腹腔内に投与した後、約 24 時間毎に 5 日間採血した。血液中 GOT 活性値は測定誤差を生じやすいため、ここでは GPT 活性のみを測定した。その結果、どちらのラインのマウスも、500ng/kg の DT 投与では、DT 投与後 2 日目から血液中 GPT 活性が上昇し 4 日目までに死亡したが、50ng/kg の DT 投与では血液中の GPT 活性がほとんど変わらなかった(図 1-11)。

#### 初代培養の肝細胞を用いた解析

肝臓にヒト HB-EGF を過剰発現させたマウス (Saito et al., 2001) で外科的に肝切除を行うと、その後の肝実質細胞の増殖の加速が見られたという報告がある (kiso et al., 2003)。またこのマウスの Tg+ と Tg- では、初代培養した時の肝細胞の増殖速度が異なる (personal communication)。そこでまず、Alb-TR1 と Alb-TR2 の初代培養の肝細胞の増殖速度を比較することで、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF 発現細胞の評価を試みた。

Alb-TR1 6M2 と Alb-TR2 1M11 のマウスから、コラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞を分離し、生細胞数を測定した後、コラーゲン処理したプレートにまい

て培養した。そして、<sup>3</sup>H ラベルチミジン溶液を取り込ませて DNA 合成量を測定した。その結果、ポジティブコントロールとなる Alb-TR1 6M2 Tg+のマウスから調整した肝細胞の DNA 合成量は、ネガティブコントロールとなる Tg-のマウスから調整した細胞と顕著な差は見られなかった(図 1-12)。よって、この実験系で Alb-TR1 6M2 と Alb-TR2 1M11 との比較を行うのは困難であると判断した。

次に別の実験により、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF 発現細胞の評価を試みた。DT 感受性が高い Vero 細胞では、培養溶液中に TPA 試薬を加えるとタンパク質合成量の低下が抑えられる(図 1-13A)。これは、TPA 刺激により DT 受容体として機能する膜結合型 HB-EGF の量が減少し、DT 感受性が低下したと考えられる。そこで初代培養の肝細胞で、TPA 刺激の有無によって DT 感受性に違いが見られるかどうかを調べた。その結果、野生型ヒト HB-EGF を発現する Alb-TR1 6M2 の Tg+マウスより調整した肝細胞に TPA 刺激を加えても、Vero 細胞で見られたような DT 感受性の低下は見られなかった(図 1-13B)。さらに 6M2 由来の肝細胞に様々な濃度の TPA を加えて調べたが、DT 感受性はほとんど変わらなかった (data not shown)。

#### 血液中 DT 濃度の測定

肝臓に発現させたヒト HB-EGF の細胞外領域がプロテアーゼによる切断を受けることで血液中に分泌され、投与した DT を中和する可能性を考えた。そこで、50 $\mu$ g/kg の DT を腹腔内投与してから 1, 2, 4, 7 および 24 時間後の血清中 DT 濃度を調べた。しかし、Alb-TR1 6M2 の Tg-と Tg+の個体で血清中 DT 濃度に顕著な差は見られなかった。

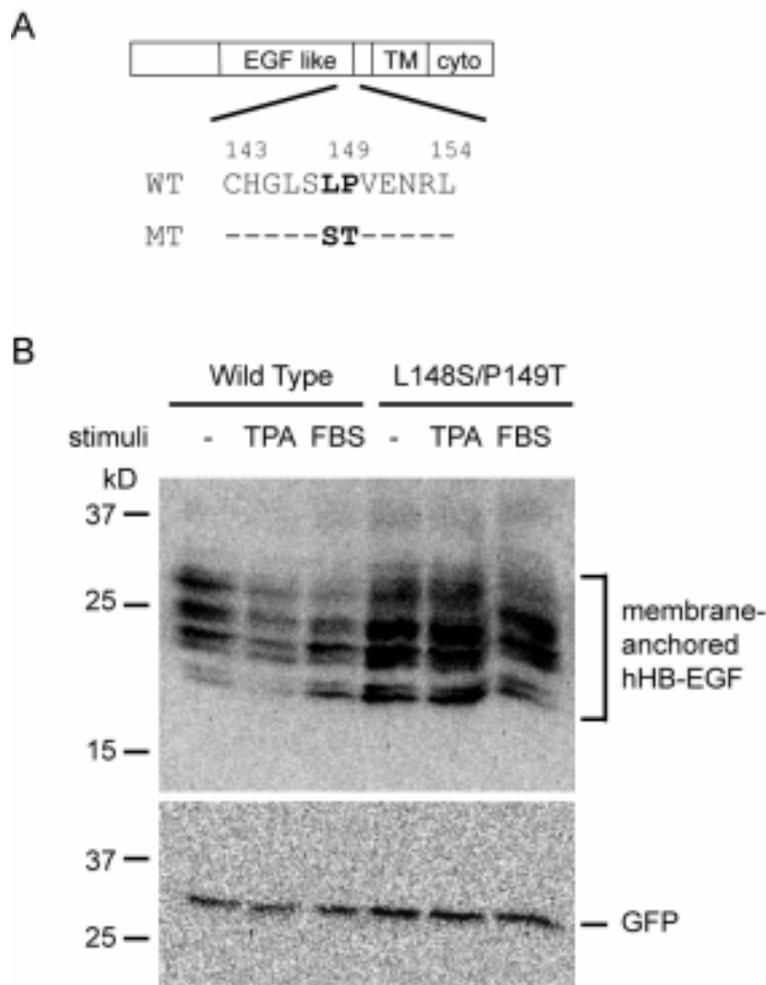


図 1-6 L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF の切断確認

A. ヒト HB-EGF の概略図と変異挿入箇所のアミノ酸残基を示した。EGF-like : EGF 様ドメイン , TM : trans-membrane ドメイン , cyto : 細胞質ドメイン。

B. 野生型 ( Wild Type ) と L148S/P149T 変異型のヒト HB-EGF を導入したマウス NIH 3T3 細胞を無血清培地中で 18 時間培養した後 , 64nM TPA や 10% FBS を加えさらに 30 分間培養し細胞を回収した。そして , ヒト HB-EGF の EGF 様ドメインを認識する抗体を用いて Western Blot を行い , 膜結合型ヒト HB-EGF の切断を調べた。また , ヒト HB-EGF を導入した細胞は IRES 配列により GFP を同時に発現させており , ローディングコントロールとして GFP 抗体を用いて検出した結果を下に並べた。膜結合型ヒト HB-EGF の複数のバンドは , 様々な N 末端の切断や糖鎖修飾を表している。

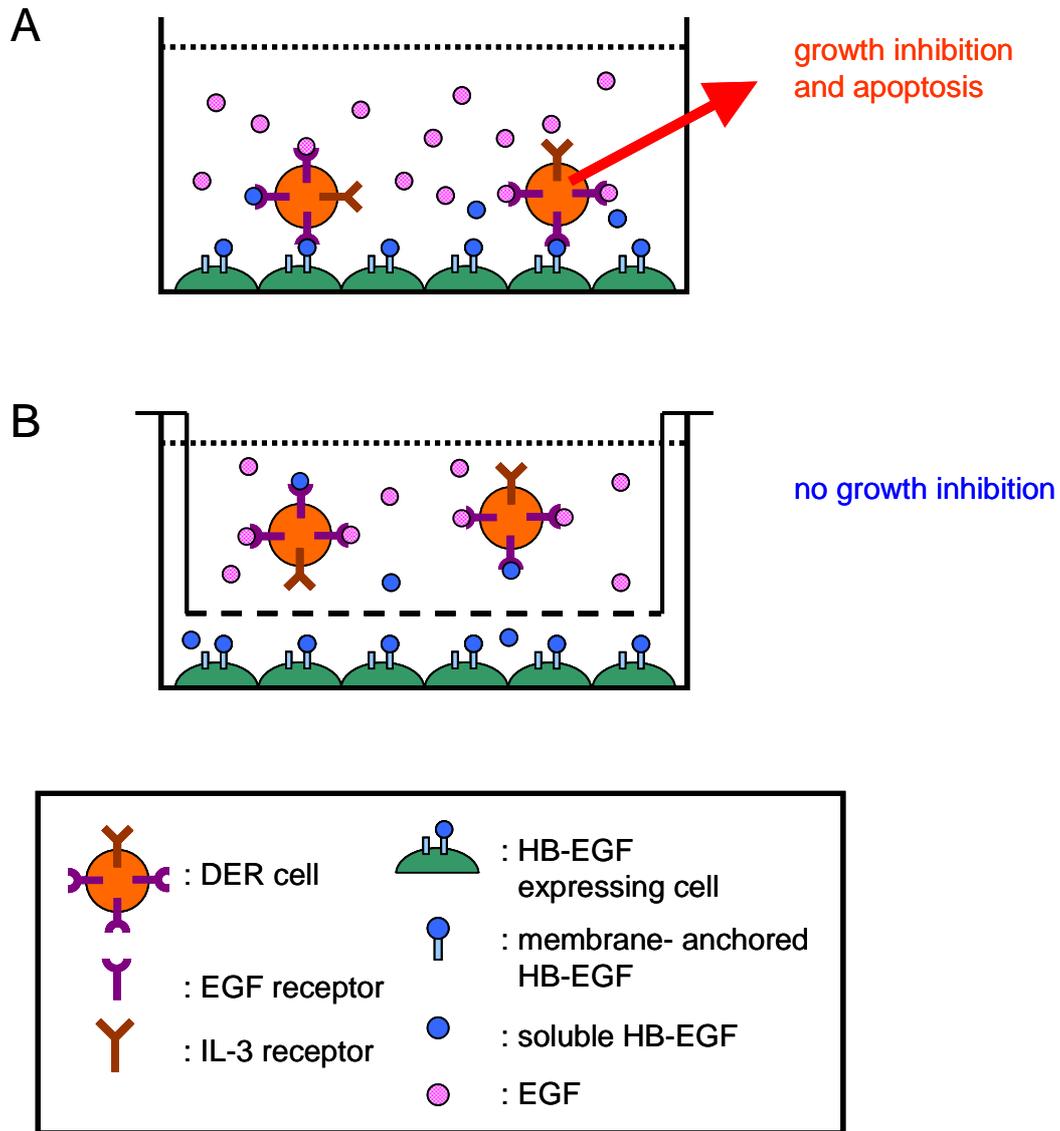


図 1-7 膜結合型 HB-EGF の増殖抑制効果を調べる実験系

A のように、EGF や HB-EGF 依存的に増殖する DER 細胞を、増殖に十分な量の EGF の存在下で HB-EGF を発現させた細胞と共に培養すると、DER 細胞の増殖は抑制されアポトーシスを起こすことが報告されている。この実験条件では、HB-EGF の膜結合型と分泌型の両方が DER 細胞に作用できる条件になっている。しかし B のように膜で区切り、分泌型の作用のみを見る実験と比較を行うことにより、A で見られた増殖抑制効果は HB-EGF の膜結合型の作用によるものであるとされている。(Iwamoto et al., 1999)

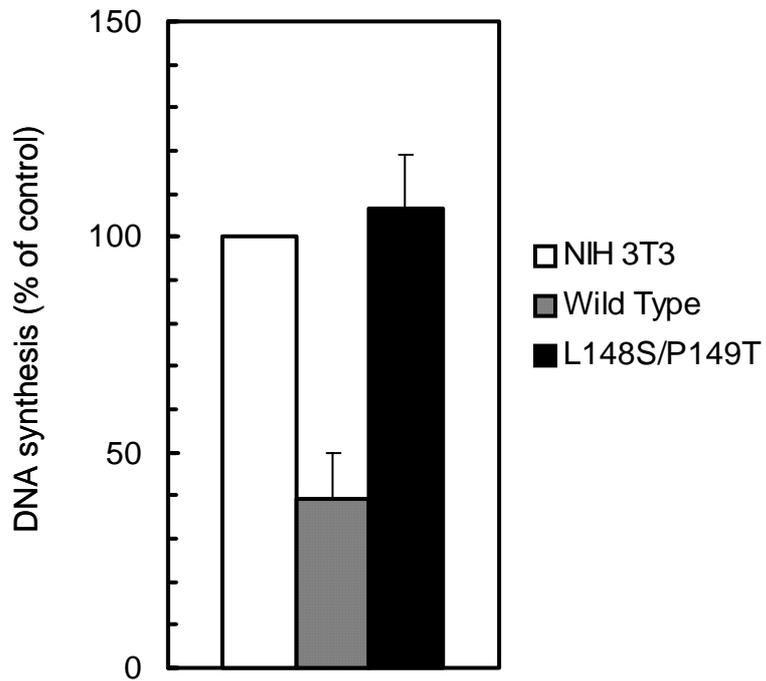


図 1-8 L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF の増殖抑制効果

DER 細胞を 5%の WEHI-3 培養上清を添加した培地中で、ヒト HB-EGF を発現した細胞と同じ 6 ウェルプレートで 36 時間培養した後、<sup>3</sup>H ラベル化チミジン を 4 時間取り込ませ DNA 合成量を測定した。縦軸は、NIH 3T3 細胞と共に培養した時の、DER 細胞の DNA 合成量を 100%として表した。値は 4 つの実験の平均で、バーは標準誤差を示す。

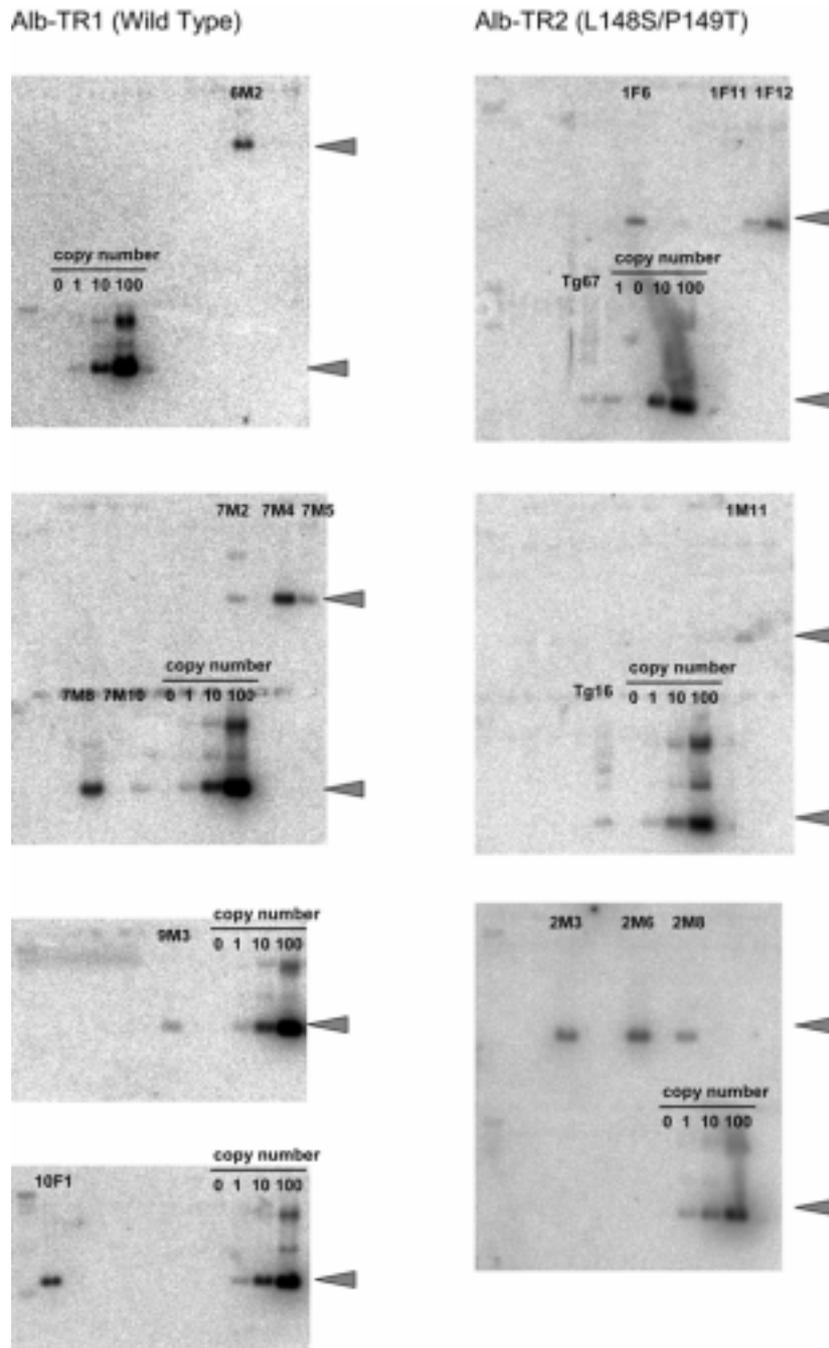
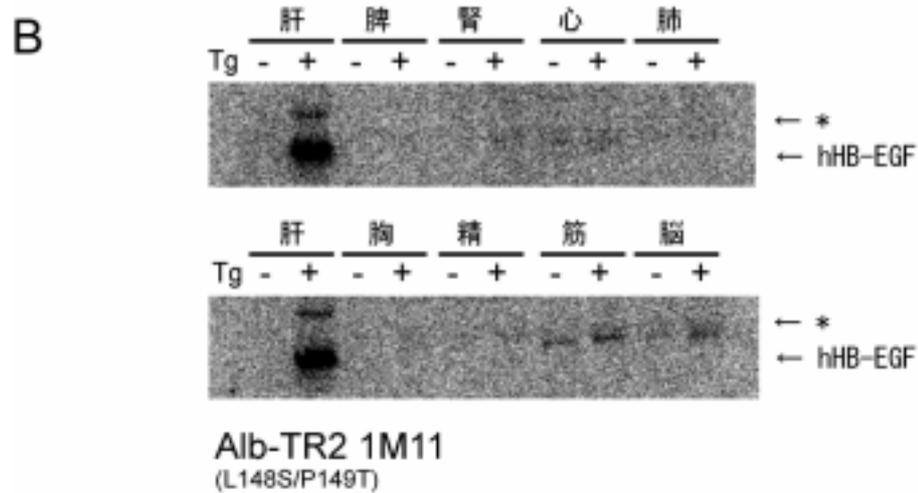
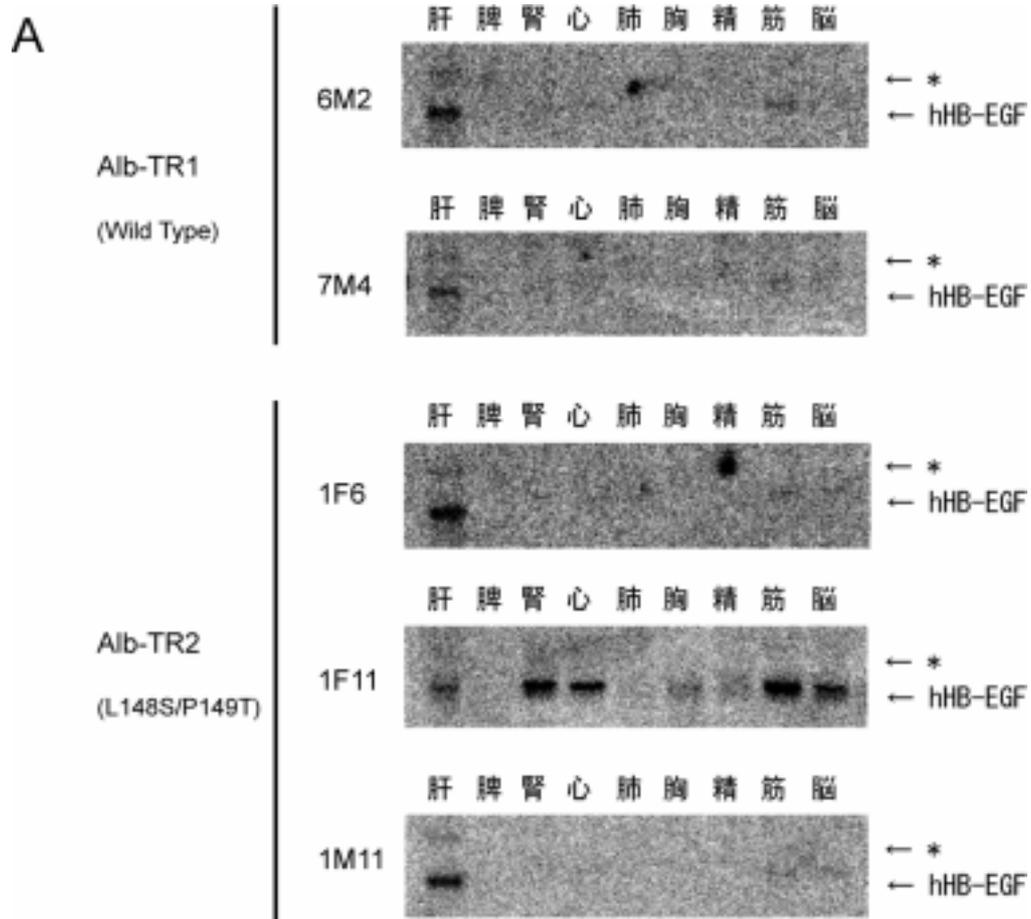


図 1-9 肝炎モデルマウスの Southern Blot

マウス尻尾より回収したゲノム DNA を各レーンに 5 $\mu$ g ずつ泳動し、トランスジーン  
の挿入を Southern Blot により調べた。



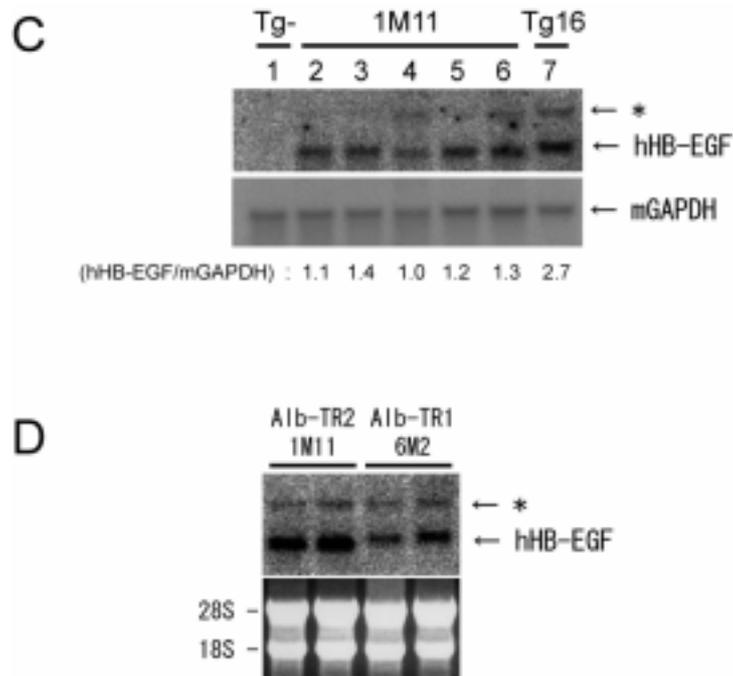


図 1-10 肝炎モデルマウスの Northern Blot

A. 肝炎モデルトランスジェニックマウスの組織(肝臓,脾臓,腎臓,心臓,肺,胸腺,精巣,筋肉,脳)から RNA を回収し,ヒト HB-EGF 遺伝子の発現の有無を Northern Blot によって調べた。

B. A で用いた Alb-TR2 1M11 の Tg+マウスについて,Tg-マウスから回収したサンプルと並べて,ヒト HB-EGF 遺伝子の発現の有無を Northern Blot によって調べた。

C. Alb-TR2 1M11 の Tg+マウス 5 匹の肝臓から RNA を回収し,ヒト HB-EGF 遺伝子の発現量を Northern Blot によって比べた。ここではマウス GAPDH の発現量で補正し,肝臓におけるヒト HB-EGF 遺伝子の発現比を求め,その値を下に並べて示した。

D. Alb-TR1 6M2 と Alb-TR2 1M11 での肝臓のヒト HB-EGF の発現比を調べた。ここでは,それぞれ 2 匹ずつの肝臓から回収した RNA を泳動した結果を示している。この 2 つのラインの発現比(平均)は,6M2:1M11=1.0:2.0 であった。

\*印の位置に現れるバンドは,非特異的バンドであると考えられる。

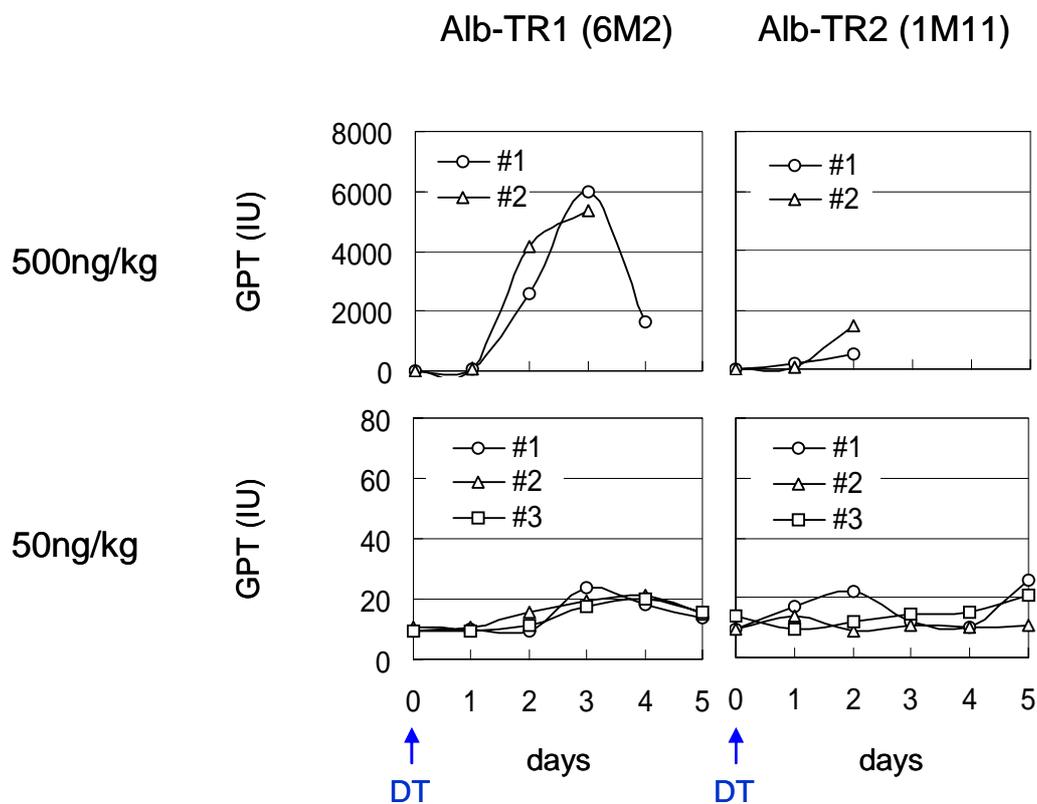


図 1-11 DT 投与後の血液中 GPT 活性の比較

Alb-TR1 6M2 と Alb-TR2 1M11 のマウス (F1 世代) に DT を腹腔内投与し、血液中の GPT 活性を測定することで比較を行った。

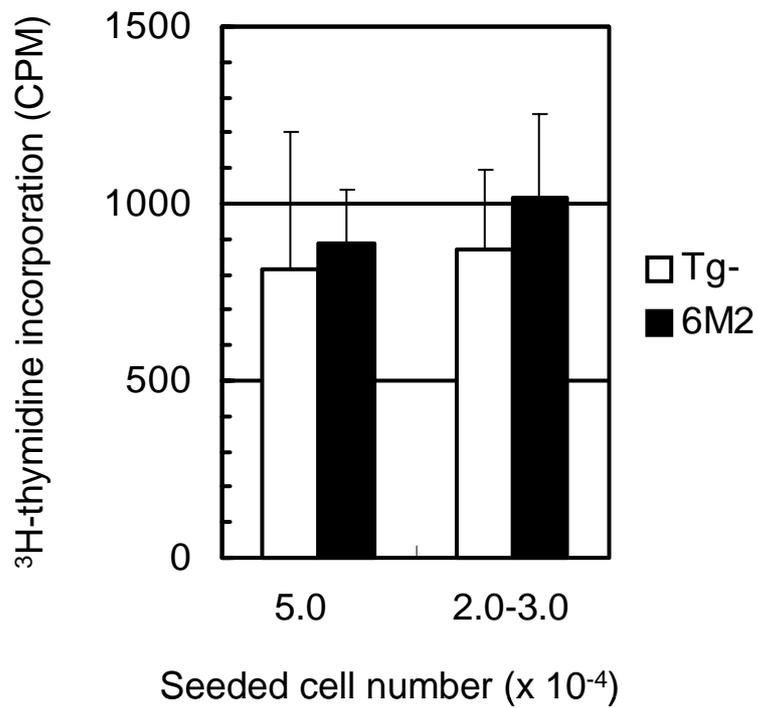


図 1-12 初代培養肝細胞の DNA 合成

コラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞を分離し、生細胞数を測定した後、コラーゲン処理したプレートにまいて培養した。そして、 $^3\text{H}$ ラベルチミジン溶液を取り込ませて DNA 合成量を測定した。値は、それぞれ 10 匹のマウスから採取した肝細胞の DNA 合成量の平均を示し、バーは標準偏差を示している。

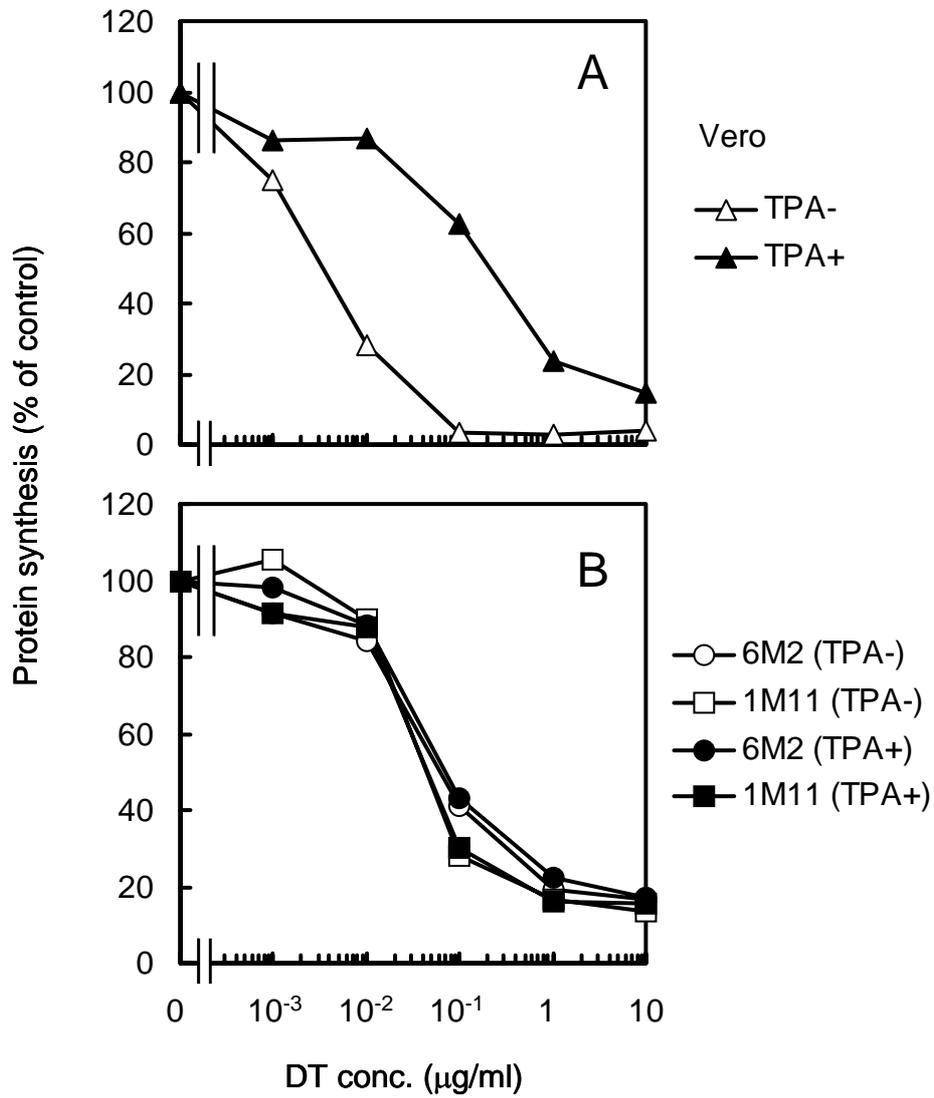


図 1-13 TPA 刺激時の DT 感受性

TPA 刺激の有無によって DT 感受性に違いが見られるかどうかを調べるため, TPA を加えてから 30 分後に DT を加えて, さらに 2 時間培養した。DT 投与 1.5 時間後に <sup>35</sup>S ラベル化 Met/Cys 溶液を加えて, タンパク質合成量を測定した。A は Vero 細胞で, B は初代培養の肝細胞の結果を示す。

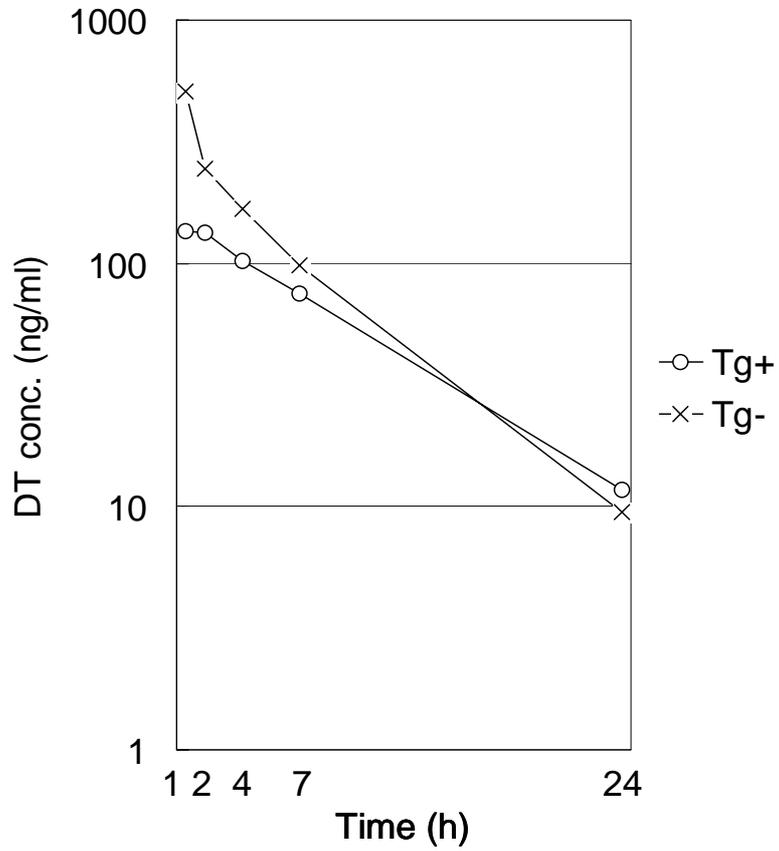


図 1-14 血液中 DT 濃度の測定

Alb-TR1 6M2 の Tg+ と Tg- マウス，それぞれ 2 匹ずつの腹腔内へ DT (50 $\mu$ g/kg) を投与し，1，2，4，7 および 24 時間後の血清中 DT 濃度を調べた。

	Tg+ (tail cut 腹数)	Tg+ 率	発現量	DT 投与 (ng/kg)		備考
				5000	500	
野生型 (Tg-)				影響なし(3/3)	影響なし(3/3)	
Alb-TR1 (Wild Type) 9 匹誕生	6M2	24/72 (9)	33%	++		死亡(2/2)
	7F4	0/7 (2)	0%			
	7M2	(0)				
	7M4	10/18 (3)	56%	+		肝障害(2/2)
	7M5	8/16 (3)	50%	+		肝障害(2/2)
	7M8	(0)				1
	7M10	(0)				
	9M3	0/10 (2)	0%			
	10F1	1/4 (1)	25%			
Alb-TR2 (L148S/P149T) 7 匹誕生	1F6	11/23 (3)	48%	+	死亡(2/2)	肝障害(2/2)
	1F11	2/4 (1)	50%			2
	1F12	3/23 (3)	13%			
	1M11	32/64(11)	50%	+++	死亡(2/2)	死亡(2/2)
	2M3	9/46 (7)	20%		死亡(2/2)	死亡(1/1)
	2M6	2/22 (3)	9%			
	2M8	4/37 (6)	11%			肝障害(1/1)

表 1-2 肝炎モデルマウスの解析結果

肝炎モデルマウスは、2003年4月より受精卵へのインジェクションを開始し、この表には2004年2月1日までのF1世代の解析結果を示した。発現量の項目には、Northern Blot で得られた、肝臓でのヒト HB-EGF の量を3段階で評価し、「+」の数が多い程発現量が多いことを示す。DT は腹腔内へ投与し、GPT 活性値 50 以上で肝障害と表示した。DT 投与結果の、「影響なし」や「死亡」などの右側の括弧内は、(その結果が見られた個体数/調べた個体数)を示している。ここではF1世代のTg+率も求めており、AlbTR1の7M4、7M5とAlbTR2の1F6、1F11、1M11以外のラインでは、F1世代のTg+マウスが誕生した割合が半分よりも少なかった。備考の、1は、mating前にファウンダーマウス死亡、2は、他の組織でヒトHB-EGFが発現していたことを示す。

## (1-2) 培養細胞を用いた実験系の検証

培養細胞を用いてヒト HB-EGF の増殖因子活性を測定するにあたり，改めて実験系の検証を行った。

### 強制分泌型での増殖因子活性

プロテアーゼによる膜結合型の切断に耐性を持つ変異型ヒト HB-EGF は，分泌型の増殖因子活性を測定することは通常不可能である。そこで Pro<sup>149</sup> の直後に終止コドン挿入し，膜貫通ドメイン以下を持たない強制分泌型 ( $\Delta$ TM と表記) のヒト HB-EGF 遺伝子をもつプラスミドを構築した (図 1-15A)。そして，同じ量のタンパク質が産出されるようにレトロウイルスベクターを用いて細胞に導入し，その細胞と共に 36 時間培養した DER 細胞の DNA 合成量を測定した。その結果，DER 細胞の DNA 合成量は，L148S/P149T 変異型 ( $\Delta$ TM) や L148S 変異型 ( $\Delta$ TM) と野生型 ( $\Delta$ TM) とで変わらなかった (図 1-15B)。

この実験では，膜結合型として合成可能な野生型ヒト HB-EGF を発現させた細胞と共に培養した時の DER 細胞の DNA 合成量をコントロールとして用いた。このコントロールとして用いた細胞では，合成された膜結合型ヒト HB-EGF のすべてが分泌型となる訳ではないので，強制分泌型 ( $\Delta$ TM) を発現した細胞の方が培地中に分泌されるヒト HB-EGF の量は多くなり，DER 細胞の DNA 合成量は大きくなると予想された。しかし，強制分泌型 ( $\Delta$ TM) を発現させた細胞と共に培養した時の DER 細胞の DNA 合成量は，コントロールとほとんど同じであった。そこでこの原因を考えたところ，この実験系では，ヒト HB-EGF 発現細胞の数をプレートでコンフルエントとなる数の 1 箇所では測定を行っていないため，観察された DNA 合成量が，上昇している途中を見た結果であるのか，すでに十分に増殖した後の結果であるのかが分からないことが考えられた。そこで次に，プレートにまくヒト HB-EGF 発現細胞数の違いによって，DER 細胞の DNA 合成量に変化が見られるかどうかを調べた。

### 増殖因子活性測定系の検証

プレートにまくヒト HB-EGF 発現細胞数の違いによって，DER 細胞の DNA 合成量に変化が見られるかどうかを調べた。ここでは，膜結合型ヒト HB-EGF の主要な切断部位である Leu<sup>148</sup> (Higashiyama et al., 1992) の直後に終始コドン挿入したヒト HB-EGF 遺伝子をレトロウイルスベクターによって導入して得られた分泌型発現細胞 (soluble form と表記)，および膜結合型を合成可能な野生型ヒト HB-EGF 遺伝子を同様に導入した得られた膜結合型発現細胞 (membrane-anchored form と表記) を用いて，共培養した時の DER 細胞の DNA

合成量を測定した。その結果、膜結合型発現細胞と共に培養した時は、プレートにまく細胞数が多い方が DER 細胞の DNA 合成量が増加した。しかし、分泌型発現細胞と共に培養した時は、プレートにまく細胞数が多い時の方が DER 細胞の DNA 合成量が減少した。このように、プレートにまくヒト HB-EGF 発現細胞数の違いによって、膜結合型発現細胞と分泌型発現細胞とで、DER 細胞の DNA 合成量が大きく異なった（図 1-16A）。また生細胞数測定試薬 SF を用いて DER 細胞の生細胞数を簡便に測定する実験でも同様の傾向が見られた（図 1-16C）。上述のように、培地中に分泌されるヒト HB-EGF の量は、分泌型発現細胞の方が膜結合型発現細胞よりも多いことが予想される。よってこれらの結果より、DER 細胞は分泌型ヒト HB-EGF の量に依存して増殖するが、分泌型ヒト HB-EGF の量が多すぎる時は減少してしまうことが考えられた。

さらに、膜結合型 HB-EGF による増殖抑制効果を調べる実験系（図 1-7）の検証を行った。ここでは図 1-8 と同様に、培地中に WEHI-3 の培養上清を加えて、共培養した時の DER 細胞の DNA 合成量を測定した。その結果、膜結合型状態にならない分泌型発現細胞と共に培養した時も、DER 細胞の増殖抑制効果は見られた（図 1-16B）。よって、この増殖抑制効果は膜結合型の機能ではなく、分泌型の機能によるものであることが示された。先ほどと同様に、生細胞数測定試薬 SF を用いて DER 細胞の細胞数を指標にした実験でも同じ結果が得られた（図 1-16D）。

そこで、次に L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF の EGF 受容体との結合活性について再検証を行った。

#### ホルマリン固定時の増殖因子活性

膜結合型ヒト HB-EGF の EGF 受容体との結合活性を測定する方法としては、HB-EGF 過剰発現細胞をホルマリンで固定した後、その上で培養した DER 細胞への増殖刺激活性を測定する方法が報告されている（Higashiyama et al., 1995）。そこで、ホルマリン固定時および非固定時の増殖因子活性を、DER 細胞の細胞数の増加を指標として調べた。その結果、ホルマリンで固定されていない L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF は、野生型に比べ DER 細胞への増殖刺激が大きく減少していた（図 1-17A）。これに対して、ホルマリンで固定された L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF は、DER 細胞に対して野生型とほとんど変わらない増殖刺激活性を持っていた（図 1-17B）。このことより、L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF の EGF 受容体との結合活性は減少していなかったことが示された。

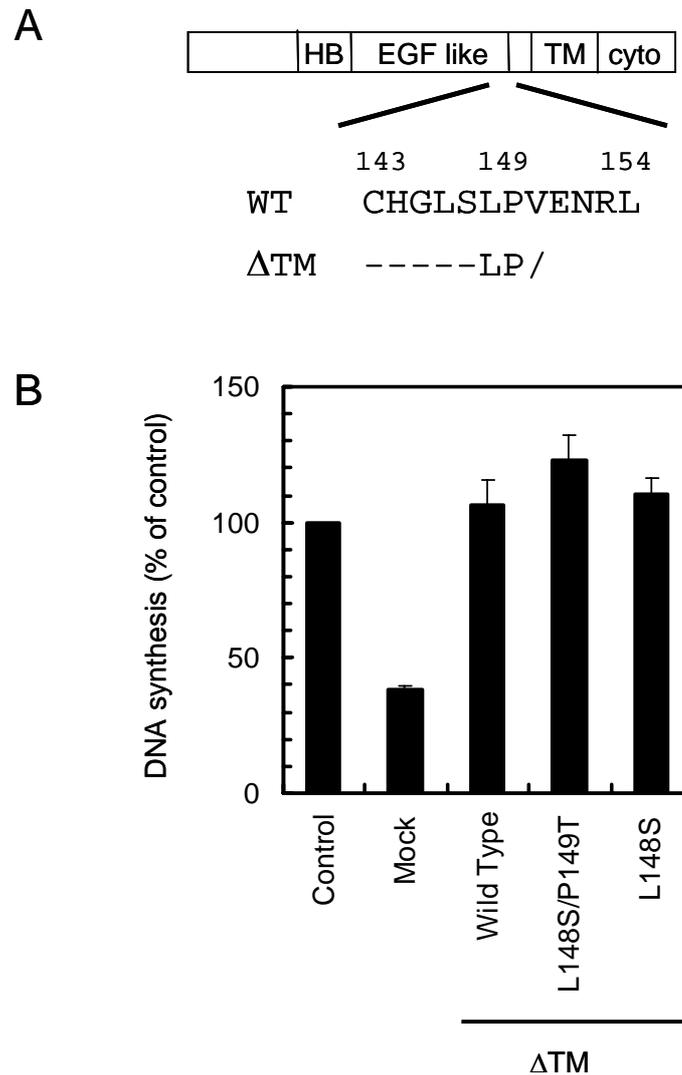


図 1-15 強制分泌型での増殖因子活性

A. 強制分泌型 ( $\Delta$ TM) は Pro<sup>149</sup> の直後に終始コドン挿入してあり、野生型 (WT) では存在する膜貫通ドメイン以下を持たない。図は、ヒト HB-EGF の概略図と EGF 様ドメインの C 末端付近のアミノ酸配列を示す。HB: ヘパリン結合ドメイン, EGF-like: EGF 様ドメイン, TM: 膜貫通ドメイン, cyto: 細胞質ドメイン。

B. 強制分泌型ヒト HB-EGF ( $\Delta$ TM) 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入した NIH 3T3 細胞と共に DER 細胞を 36 時間培養し、DER 細胞の DNA 合成量を測定した。膜結合型として合成される野生型ヒト HB-EGF を導入した細胞と共に培養した時の DER 細胞の DNA 合成量をコントロールとした。

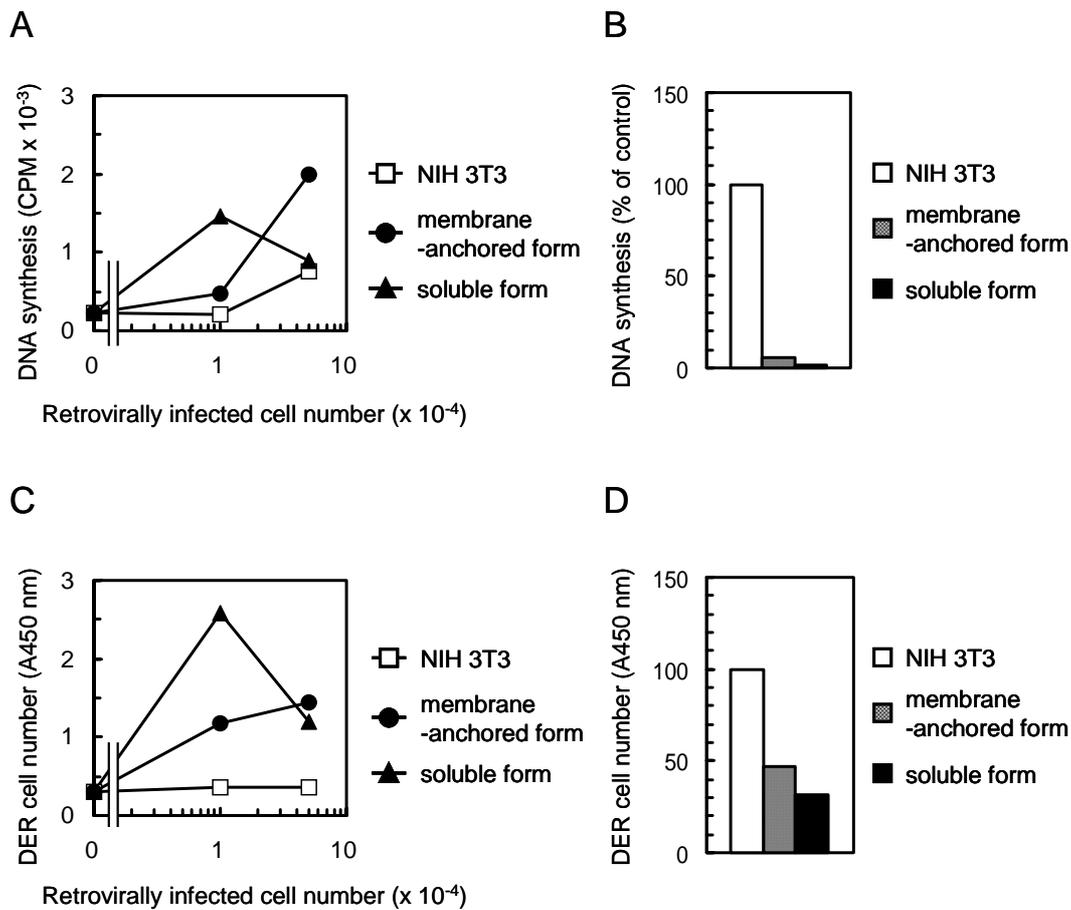


図 1-16 ヒト HB-EGF 増殖因子活性測定系の検証

A. 膜結合型ヒト HB-EGF の主要な切断部位である Leu<sup>148</sup> の直後に終始コドン挿入したヒト HB-EGF 遺伝子をレトロウイルスベクターによって導入して得られた分泌型発現細胞 (soluble form), および膜結合型を合成可能な野生型ヒト HB-EGF 遺伝子を同様に導入して得られた膜結合型発現細胞 (membrane-anchored form) を,  $1 \times 10^4$  個または  $5 \times 10^4$  個ずつ 6 ウェルプレートにまいた。その後, DER 細胞 ( $2.0 \times 10^5$  個/2ml) を加えて 36 時間共培養した時の DER 細胞の DNA 合成量を測定した。

B. レトロウイルス感染細胞をそれぞれ  $5 \times 10^4$  個ずつ 6 ウェルプレートにまき, WEHI-3 培養上清と DER 細胞 ( $2.0 \times 10^5$  個/2ml) を加えて 36 時間共培養した時の DER 細胞の DNA 合成量を測定した。

C-D. それぞれ A, B と同様の実験を行い, DER 細胞の増殖は生細胞数測定試薬 SF を用いて測定した。

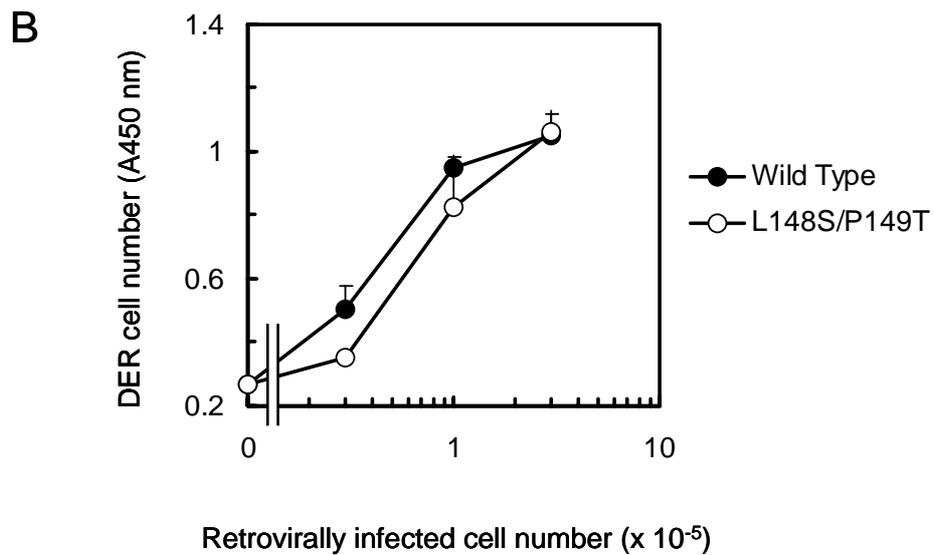
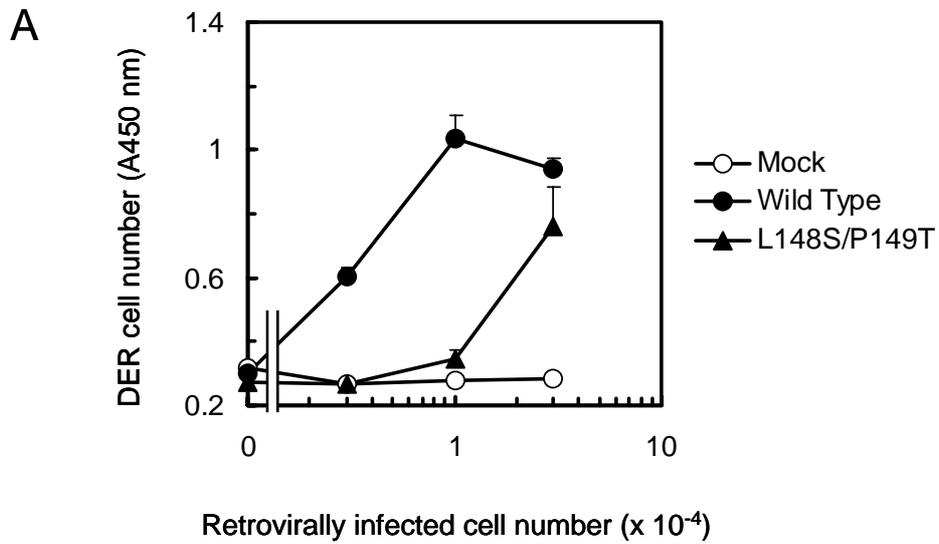


図 1-17 ホルマリン固定時の増殖因子活性

- A. ホルマリンで固定していない時の，DER 細胞への増殖刺激活性を測定した。  
 B. ホルマリンで固定した時の，DER 細胞への増殖刺激活性を測定した。固定した後の細胞は DER 細胞との共培養中に増殖できないので，プレートにまいたレトロウイルス感染細胞数は，A の実験を行った時よりも 1 桁多い。

## 【2】新たな変異型ヒト HB-EGF の探索と解析

### (2-1) 培養細胞を用いた探索と解析

#### 変異挿入アミノ酸残基の検討

ヒト HB-EGF の DT 受容体機能を失わずに増殖因子活性を減少させるのに必要なアミノ酸残基を探すために、DT とヒト HB-EGF の EGF 様ドメインが結合した複合体の結晶構造解析 (Louie et al., 1997) と、ヒト EGF と EGF 受容体との親和性に関するこれまでの報告 (Campion et al., 1994) を利用した。それらの報告の概要は図 1-18 にまとめた。最初に、EGF 受容体との結合に関わるアミノ酸の情報が必要になるが、ヒト HB-EGF では調べられていない。しかし、HB-EGF と同じ EGF ファミリーに属する増殖因子の EGF や Transforming Growth Factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) では研究が行われており、増殖因子活性に影響するアミノ酸残基はヒト EGF の研究から推測した。

図 1-18A と C において緑色で示したヒト EGF のアミノ酸残基への変異によって EGF 受容体結合活性が減少されたことが報告されている (Campion et al., 1994)。また、部位特異的変異導入法の研究により、図 1-18A と B において青色で示したヒト HB-EGF の EGF 様ドメインの Phe<sup>115</sup>、Leu<sup>127</sup> と Glu<sup>141</sup> の 3 つのアミノ酸は、DT が結合するのに重要であることが示されている (Mitamura et al., 1997)。したがって、EGF 受容体への親和性を減少させる変異体候補は、DT 結合に重要である、これらの 3 つのアミノ酸残基の置換はできない。さらに、DT とヒト HB-EGF の EGF 様ドメインが結合した複合体の結晶構造解析 (Louie et al., 1997) より、Ile<sup>117</sup>、Arg<sup>128</sup> と Tyr<sup>138</sup> は DT と相互作用していない。しかし、ヒト HB-EGF の Ile<sup>117</sup>、Arg<sup>128</sup> と Tyr<sup>138</sup> にそれぞれ対応するヒト EGF の Leu<sup>15</sup>、Asp<sup>27</sup> と Tyr<sup>37</sup> はアミノ酸置換によって EGF 受容体結合活性が減少している。ヒト HB-EGF の Val<sup>124</sup> のアミノ酸残基は DT と相互作用しているが、ヒト HB-EGF の Val<sup>124</sup> に対応するヒト EGF の Ile<sup>23</sup> は EGF 受容体と低い親和性を示す。V124L の変異は DT の結合活性は野生型の 90% を保持していたことから (Mitamura et al., 1997)、Val<sup>124</sup> の疎水性アミノ残基への変異は DT の結合にそれほど影響を与えないと考えられた。Leu<sup>148</sup> のアミノ酸残基はヒト HB-EGF の結晶構造解析の複合体には含まれていなかったが、ヒト HB-EGF の Leu<sup>148</sup> に対応するヒト EGF の Leu<sup>47</sup> のアミノ残基は EGF 受容体への親和性にかなり影響を与えることが示されている。ヒト EGF と EGF 受容体の細胞外領域と結合した複合体の結晶構造解析 (Ogiso et al., 2002) より、ヒト HB-EGF の Ile<sup>117</sup>、Val<sup>124</sup> と Leu<sup>148</sup> にそれぞれ対応するヒト EGF の Leu<sup>15</sup>、Ile<sup>23</sup> と Leu<sup>47</sup> は、EGF 受容体に疎水的に相互作用してい

る。よってこれらの報告に基づいて、DT 受容体機能を壊すことなく、ヒト HB-EGF の増殖因子活性を取り除くために、図 1-18A と D において黄色で示した、Ile<sup>117</sup>、Val<sup>124</sup>、Arg<sup>128</sup>、Tyr<sup>138</sup> と Leu<sup>148</sup> の 5 つのアミノ酸残基を置換した。

#### レトロウイルス感染細胞の発現確認

変異型ヒト HB-EGF の増殖因子活性と DT 受容体機能の比較を行うためには、活性を測定するヒト HB-EGF を同じように細胞に発現させる必要がある。そのため、すべての変異型ヒト HB-EGF は、レトロウイルスベクターを用いてマウス NIH 3T3 細胞に導入した。実際、それらの細胞について、Western Blot により調べたところ、レトロウイルスベクターを用いて発現させたヒト HB-EGF のタンパク質量はほとんど同じであることが確かめられた（図 1-19）。

#### ヒト HB-EGF 導入細胞での増殖因子活性

まず、ヒト EGF 受容体を過剰発現させ、HB-EGF 存在下で増殖できる DER 細胞（Iwamoto et al., 1999）を用いて変異型ヒト HB-EGF を導入した細胞の増殖因子活性を調べた。DER 細胞を変異型ヒト HB-EGF を導入した NIH3T3 細胞と共に、10% FBS 存在下で 36 時間培養した。そして、DER 細胞をピペティングによって 96 ウェルプレートに移し、生細胞数測定試薬を加えて 3 時間培養した後、DER 細胞の細胞数を測定した（図 1-20）。図 1-21A で示したように、DER 細胞は野生型ヒト HB-EGF を導入した細胞と共に培養した時に増殖し、この増殖は共培養した細胞数に依存的であった。一方、Mock 導入細胞では DER 細胞の増殖は見られなかった。I117A 変異型ヒト HB-EGF を導入した細胞は、DER 細胞の増殖を少し促し（図 1-21A）、Y138D、Y138L と L148V 変異型ヒト HB-EGF 導入細胞では、弱い増殖刺激活性しか保持していなかった（図 1-21C、D）。Val<sup>124</sup> と Arg<sup>128</sup> へのアミノ酸置換は DER 細胞への増殖刺激活性へ影響を与えなかったが（図 1-21B、C）、I117A/L148V、I117V/L148V と Y138L/L148V の二重変異型ヒト HB-EGF では、DER 細胞への増殖刺激活性をほとんど失う結果となった（図 1-21D）。

#### ヒト HB-EGF 導入細胞での DT 感受性

次に、変異型ヒト HB-EGF を導入した細胞の DT 感受性を調べた。DT はヒト HB-EGF に結合し受容体を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、タンパク質合成を阻害する（図 1-1）。そこで、変異型ヒト HB-EGF を導入した細胞を種々の濃度の DT と共に培養し、<sup>35</sup>S ラベル化 Met/Cys の取り込みによって、タンパク質合成量を測定した。その結果、野生型ヒト HB-EGF を発現した細胞では、タンパク質合成量の減少が見られたが、Mock 導入細胞では、

ほとんど見られなかった(図 1-22A)。ここでは、タンパク質合成量をコントロールの 50%へ減少させた時の DT 濃度を  $EC_{50}$  として求めて、図 1-18A に並べて表示した。I117A, I117V, R128H, R128K と L148V の変異型ヒト HB-EGF を発現した細胞は DT 感受性を示したが、この感受性は I117A の変異でわずかに低下した(図 1-22A, C, D)。V124L 変異では DT 感受性が高まり、V124F と Y138L の変異では DT 感受性が低下した(図 1-22B, C)。V124A の変異ではほとんど DT 感受性を示さず、Y138D の変異では DT 感受性が失われた(図 1-22B, C)。DT 感受性は、I117V/L148V の二重アミノ酸変異ではわずかに低下し、I117A/L148V と Y138L/L148V の変異では低下した。しかし、I117A/L148V の変異型ヒト HB-EGF は、DT 受容体機能は低下したが保持していた(図 1-22D)。これらの結果を合わせると、L148V, I117A/L148V と I117V/L148V の変異型ヒト HB-EGF は、増殖因子活性が低下しており、かつ DT 受容体機能を保持していた。

#### 分泌型ヒト HB-EGF の増殖因子活性

ヒト HB-EGF のそれぞれの変異体について、分泌型のみの増殖因子活性を調べた。分泌型ヒト HB-EGF を得るために、膜結合型ヒト HB-EGF の主要な切断部位である Leu<sup>148</sup> (Higashiyama et al., 1992) の直後に終始コドン挿入することで、強制分泌型のプラスミドを作製した。この強制分泌型のプラスミドを、高いトランスフェクション効率を得られる HeLa 細胞に導入し、その培養上清を回収した。そして、プラスミド導入 HeLa 細胞の培養上清中の分泌型ヒト HB-EGF の量を Western Blot により見積もった後(図 1-23A)、サンプル中の分泌型ヒト HB-EGF の量を揃えた(図 1-23B)。そのサンプルを 96 ウェルプレート中の DER 細胞へ加えて 36 時間経過した後、DER 細胞の細胞数を測定した。その結果、野生型ヒト HB-EGF の分泌型を導入した細胞の培養上清を加えた DER 細胞は増殖し、この増加は培養上清の量に依存した(図 1-24A)。一方、Mock 導入細胞の培養上清中では DER 細胞の増加は見られなかった(図 1-24A)。増殖刺激は、I117V の変異で若干減少した(図 1-24A)。I117A, Y138D, Y138L, I117A/L148V と Y138L/L148V の変異では、増殖刺激活性の大幅な減少が見られた(図 1-24A, B, C)。これらの結果は、図 1-21 の結果とほぼ一致していた。しかし図 1-21D で増殖刺激活性が大幅に低下していた L148V の変異では増殖刺激活性の減少が見られず、同じく I117V/L148V の変異ではわずかな減少しか見られなかった(図 1-24C)。この結果より、Leu<sup>148</sup> の置換は、分泌型と膜結合型それぞれの増殖刺激活性について、異なる影響を与える可能性が示唆された。

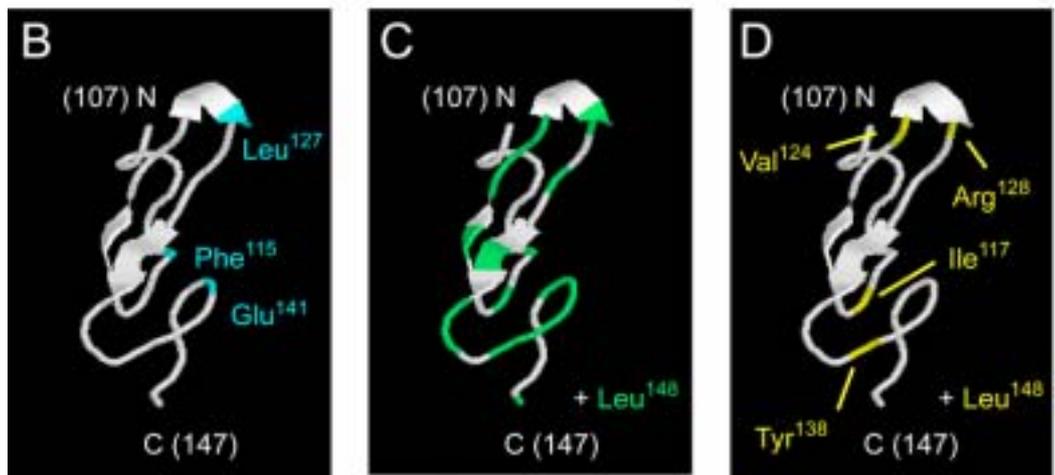
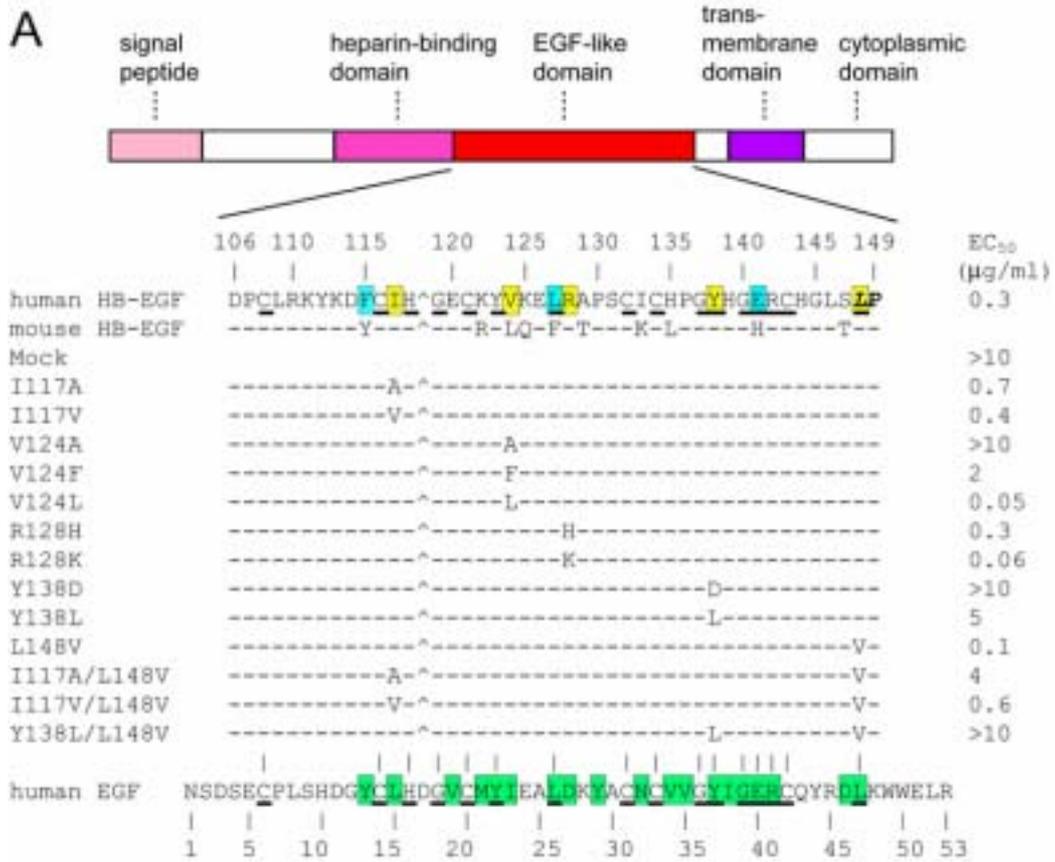
#### 膜結合型ヒト HB-EGF の切断確認

DT 受容体として機能する膜結合型ヒト HB-EGF は、細胞表面でプロテアーゼ

により切断され分泌型となる。この膜結合型の切断は、TPA 刺激によって促進される (Goishi et al., 1995)。そこで、TPA 刺激による膜結合型ヒト HB-EGF の切断を Western Blot により調べた。変異型ヒト HB-EGF 発現細胞に TPA を加えて 30 分間培養し、細胞抽出液中の HA タグを付加したヒト HB-EGF 細胞質ドメインを、抗 HA 抗体を用いて検出した。図 1-25B で、およそ 25kDa 付近の複数のバンドは膜結合型ヒト HB-EGF で、tail fragment と表記した 15kDa 付近の小さいバンドは細胞質ドメインと膜貫通ドメインからなるプロテアーゼによる切断断片を示している (図 1-25A)。TPA による切断刺激を加えると、野生型ヒト HB-EGF 発現細胞では tail fragment の量が増加したが、L148V、I117V/L148V と I117A/L148V の変異型 HB-EGF 発現細胞では tail fragment がほとんど検出できなかった (図 1-25B)。この結果より、L148V、I117V/L148V および I117A/L148V の変異型 HB-EGF は、TPA による切断刺激に耐性を持っていることが示された。

#### 膜結合型ヒト HB-EGF の増殖因子活性

膜結合型 HB-EGF は、膜に結合した状態で隣接する細胞にシグナルを伝えていると考えられている (Iwamoto et al., 1999)。図 1-21 で測定した増殖因子活性は、ヒト HB-EGF の分泌型と膜結合型の両方の増殖因子活性を表している。しかしながら、増殖因子活性の減少が見られたいくつかの変異体 (L148V、I117V/L148V および I117A/L148V) は、TPA 存在下においても切断されず、図 1-24 での分泌型による増殖刺激活性は、図 1-21 と異なっていた。そこで、いくつかの変異型ヒト HB-EGF では、分泌型を生じることができないことにより増殖因子活性の減少が見られた可能性を検証するために、膜結合型のみ増殖因子活性を調べた。レトロウイルスベクターによりヒト HB-EGF を発現した NIH 3T3 細胞を DER 細胞と共培養する前に 10%ホルマリンで固定し、ヒト HB-EGF の分泌型を生じる可能性を排除した。そして 36 時間培養した後、図 1-21 と同様に DER 細胞の細胞数を測定した。DER 細胞は、野生型ヒト HB-EGF 発現細胞をホルマリンで固定された上で共培養した時に増殖したが、Mock 導入細胞の上では増殖しなかった。L148V 変異体発現細胞と共に培養した時は、DER 細胞の増殖は減少していたが、完全にはなくならなかった (図 1-26)。このことは、図 1-21D でこの変異体で見られた増殖因子活性の大幅な減少は、分泌型を生じることができないことに起因していることを示している。しかしながら、I117V/L148V および I117A/L148V の変異体では、DER 細胞への増殖刺激活性がそれぞれ、ほとんど失っていた、または大幅に減少しており、これらの変異体ではアミノ酸置換によって、EGF 受容体との物理的な相互作用が破壊されていることが示された (図 1-26)。



## 図 1-18 変異導入アミノ酸残基の検討

### A. ヒト HB-EGF の模式図, ヒト HB-EGF の EGF 様ドメインとヒト EGF のアミノ酸配列

ヒト HB-EGF の EGF 様ドメインで,青色で囲ったアミノ酸は DT との結合に重要な 3 つの残基 (Mitamura et al., 1997) を示している。太字の斜体で示したアミノ酸は, TPA 刺激によって促進される膜結合型ヒト HB-EGF の切断に影響を与える (Hirata et al., 2001)。ヒト EGF で, 緑色で囲ったアミノ酸はアミノ酸置換により EGF 受容体との親和性が減少する (Campion et al., 1994)。マウス HB-EGF の EGF 様ドメインに示した 10 個のアミノ酸は, ヒト HB-EGF と異なる。太字の下線が引かれたアミノ酸は, ヒト HB-EGF の EGF 様ドメインとヒト EGF で保存されているアミノ酸残基を示している。この研究で置換したアミノ酸は黄色で囲った。EC<sub>50</sub> は, 図 1-22 の結果から求めた。

### B-D. ヒト HB-EGF の EGF 様ドメインの 3 次元立体構造モデル

ヒト HB-EGF の EGF 様ドメインの立体構造 (Phe<sup>107</sup>-Ser<sup>147</sup>) は, DT との複合体 (Louie et al., 1997) を参照し, それに Leu<sup>148</sup> を加えた。その立体構造モデルで, 重要なアミノ酸残基の位置を A と同じ色で示した。すなわち, DT の結合に重要な 3 つのアミノ酸残基 (B), ヒト EGF のアミノ酸置換により, EGF 受容体との親和性が減少した残基に対応するアミノ酸残基 (C), この研究で置換したアミノ酸残基 (D) を示した。

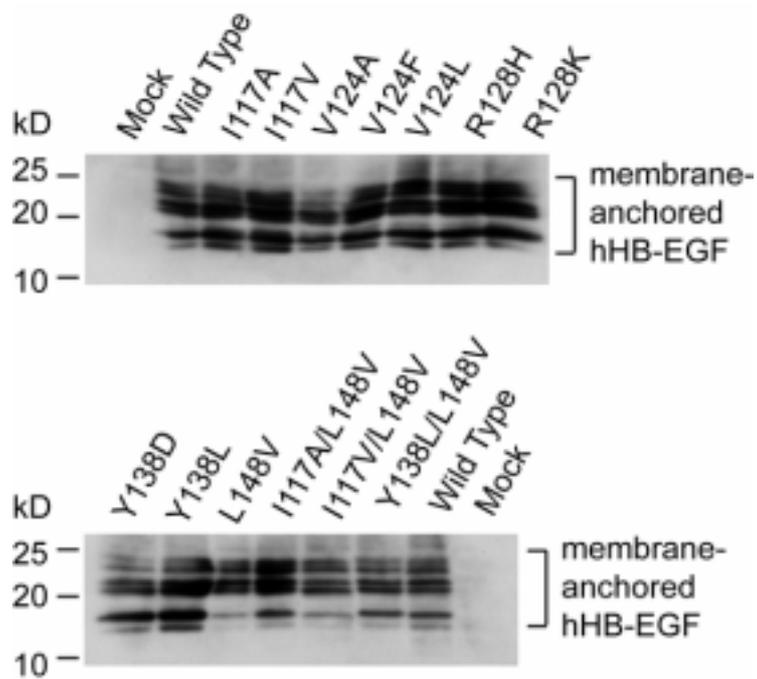


図 1-19 レトロウイルス感染細胞の発現確認

レトロウイルスベクターを用いて発現させたヒト HB-EGF タンパク質の量を，抗ヒト HB-EGF 抗体を用いた Western Blot により確認した。膜結合型ヒト HB-EGF の複数のバンドは，様々な N 末端の切断や糖鎖修飾を表している。

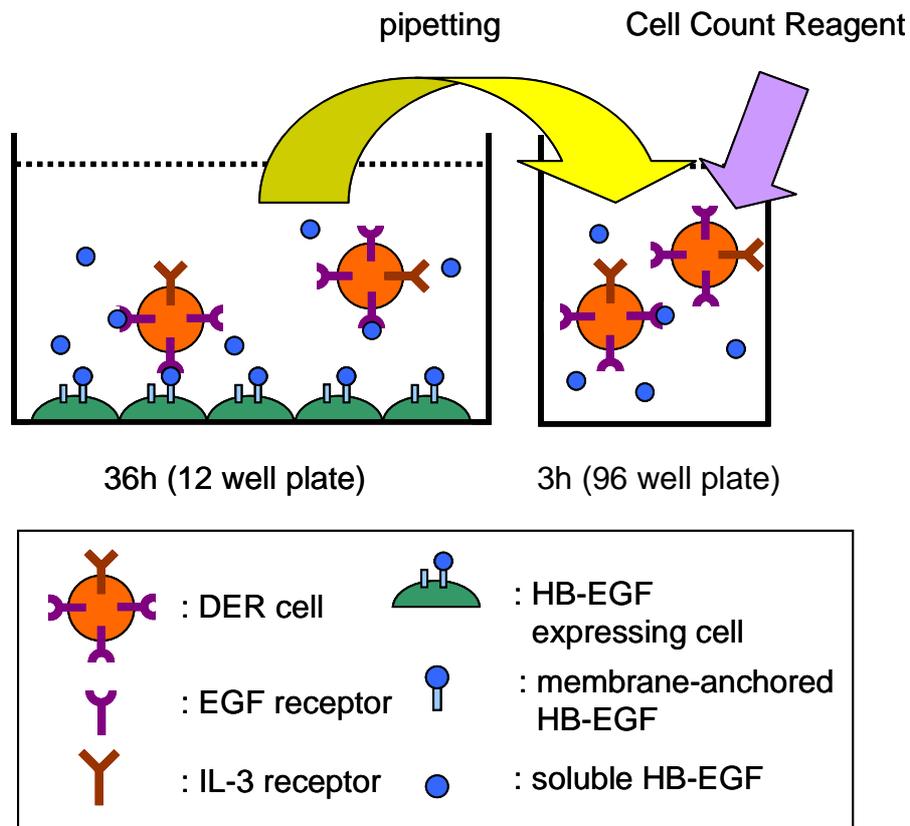


図 1-20 増殖因子活性測定法の模式図

図 1-21 では、レトロウイルスによりヒト HB-EGF 変異体を発現させたマウス NIH 3T3 細胞を 12 ウェルプレートへ調整し、ヒト HB-EGF の存在下でよく増殖する DER 細胞 ( $1 \times 10^5/2\text{ml}$ ) と共に 36 時間培養した。その後、DER 細胞をピペッティングにより 96 ウェルプレートへ移し、生細胞数測定試薬を加えて 3 時間培養した後、DER 細胞の細胞数を測定した。図 1-26 では、ヒト HB-EGF 発現細胞を 12 ウェルプレートへ調整し、10%ホルマリンで固定した後に、DER 細胞 ( $1 \times 10^5/2\text{ml}$ ) を共に培養させ同様に細胞数を測定した。

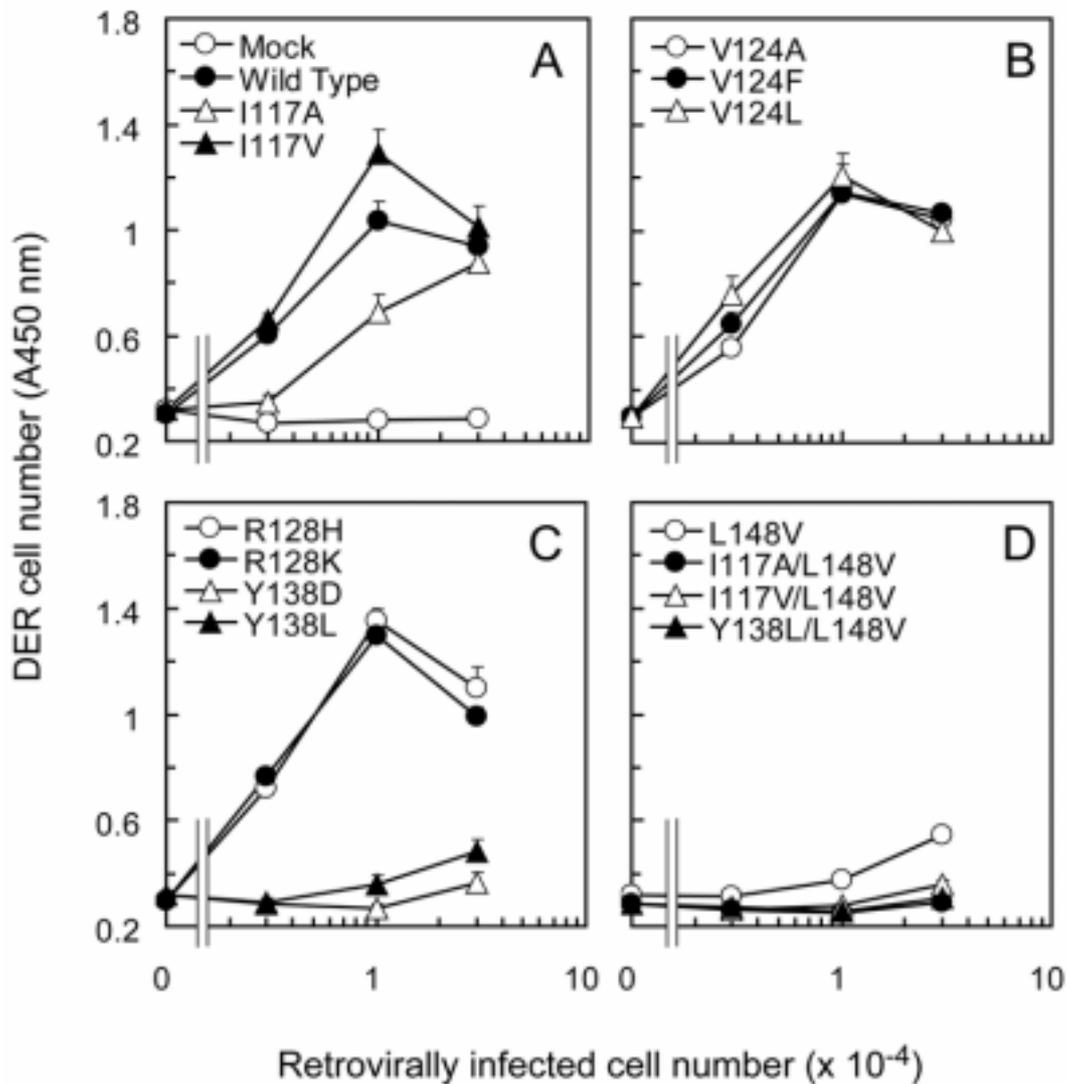


図 1-21 ヒト HB-EGF 導入細胞の増殖因子活性

A-D. レトロウイルスによりヒト HB-EGF 変異体を発現させたマウス NIH 3T3 細胞を 12 ウェルプレートへ調整し, DER 細胞 ( $1 \times 10^5/2\text{ml}$ ) と共に 36 時間培養した。その後, DER 細胞をピペティングにより 96 ウェルプレートへ移し, 生細胞数測定試薬を加えて 3 時間培養した後, DER 細胞の細胞数を測定した。値は少なくとも 4 つの実験の平均で, バーは標準誤差を示す。

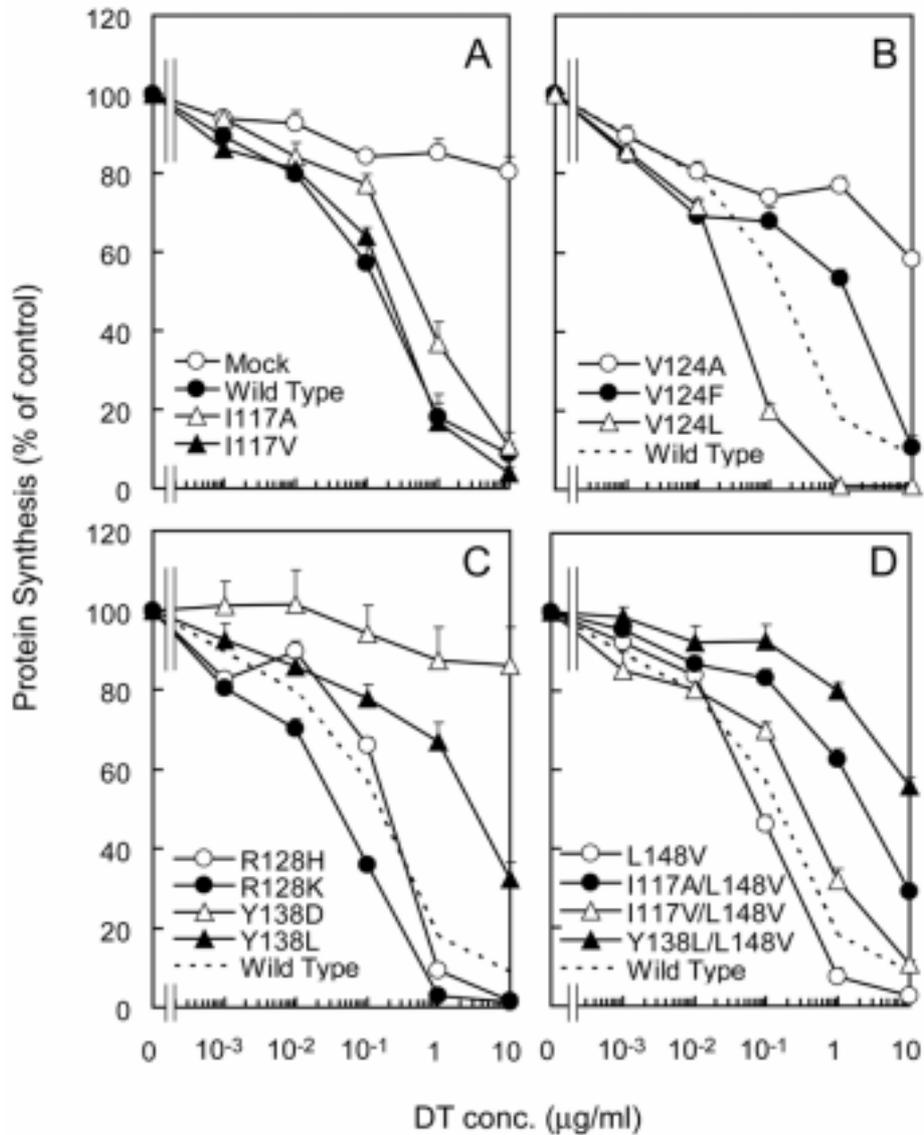
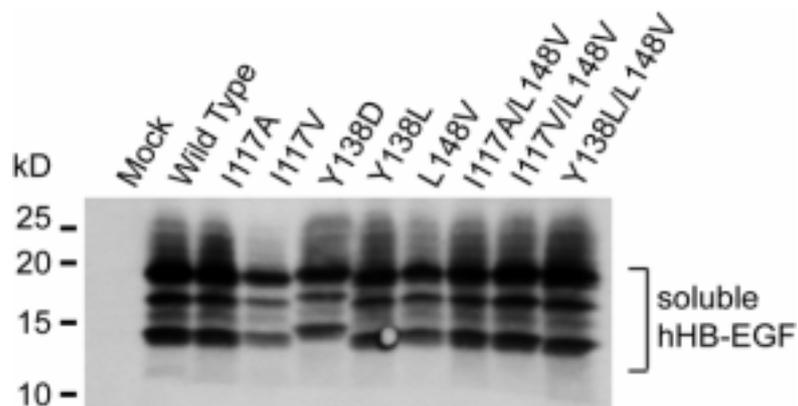


図 1-22 ヒト HB-EGF 導入細胞の DT 感受性

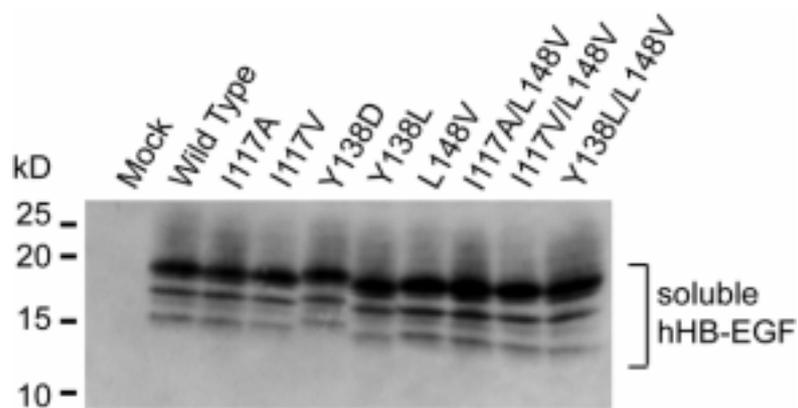
A-D. ヒト HB-EGF 変異体を発現したマウス NIH 3T3 細胞へ様々な濃度の DT を加えて 12 時間培養した後、<sup>35</sup>S ラベル化 Met/Cys を含む培地中で 1 時間培養した。そしてタンパク質への放射活性の取り込み量を測定し、DT 無添加時 (コントロール) のタンパク質合成量を 100% として表示した。ヒト HB-EGF の各変異の結果は、図 1-24A-D と同じ順序で並べた。また、コントロールの 50% へとタンパク質合成量を低下させた時の有効 DT 濃度を EC<sub>50</sub> として求め、図 1-18A に示した。値は少なくとも 4 つの実験の平均で、バーは標準誤差を示す。

A



希釈前	wt	I117A	I117V	Y138D	Y138L	L148V	I117A/ L148V	I117V/ L148V	Y138L/ L148V
wt = 1	1.00	0.95	0.57	0.76	0.85	0.75	0.89	1.00	1.00
I117V = 1	1.75	1.67	1.00	1.32	1.49	1.31	1.56	1.75	1.75

B



希釈後	wt	I117A	I117V	Y138D	Y138L	L148V	I117A/ L148V	I117V/ L148V	Y138L/ L148V
希釈倍率	1.75	1.67	1.00	1.32	1.49	1.31	1.56	1.75	1.75
wt = 1	1.00	1.04	0.96	0.98	1.06	1.14	1.15	0.98	0.99
I117V = 1	1.04	1.08	1	1.02	1.10	1.18	1.20	1.02	1.04

## 図 1-23 分泌型ヒト HB-EGF 産出量の確認

A. トランスフェクション後の Hela 細胞培養上清 15 $\mu$ l をサンプルバッファーと混ぜて泳動し、分泌型ヒト HB-EGF の量を、ヒト HB-EGF 抗体を用いた Western Blot により確認した。そして、定量した値を下に示した。ヒト HB-EGF の複数のバンドは、様々な N 末端の切断や糖鎖修飾を表している。

B. 分泌型ヒト HB-EGF の量を、(A) の結果で一番少なかったサンプルの量に合うように培地で希釈し、培養上清中の分泌型ヒト HB-EGF の量をそろえた。そして、ヒト HB-EGF 抗体を用いた Western Blot により確認した。別の日にトランスフェクションを行った Hela 細胞培養上清 3 回分について、これと同様の操作を行い、図 1-24 の測定を行った。

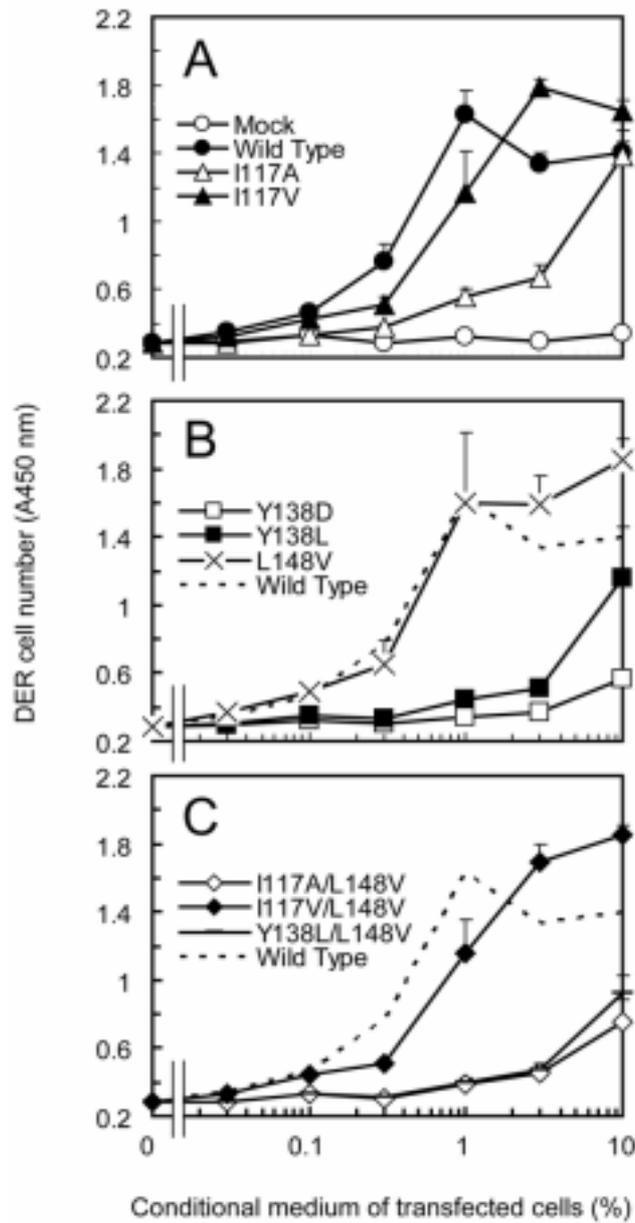


図 1-24 分泌型ヒト HB-EGF の増殖因子活性

DER 細胞を分泌型ヒト HB-EGF 変異体を含む培養上清を加えて 36 時間培養し、生細胞数測定試薬を用いて DER 細胞の細胞数を測定した。ここでは、分泌型ヒト HB-EGF の量をそろえた後の (図 1-23B) 培養上清を使用した。値は 3 回の独立して行った実験の平均で、バーは標準誤差を示す。

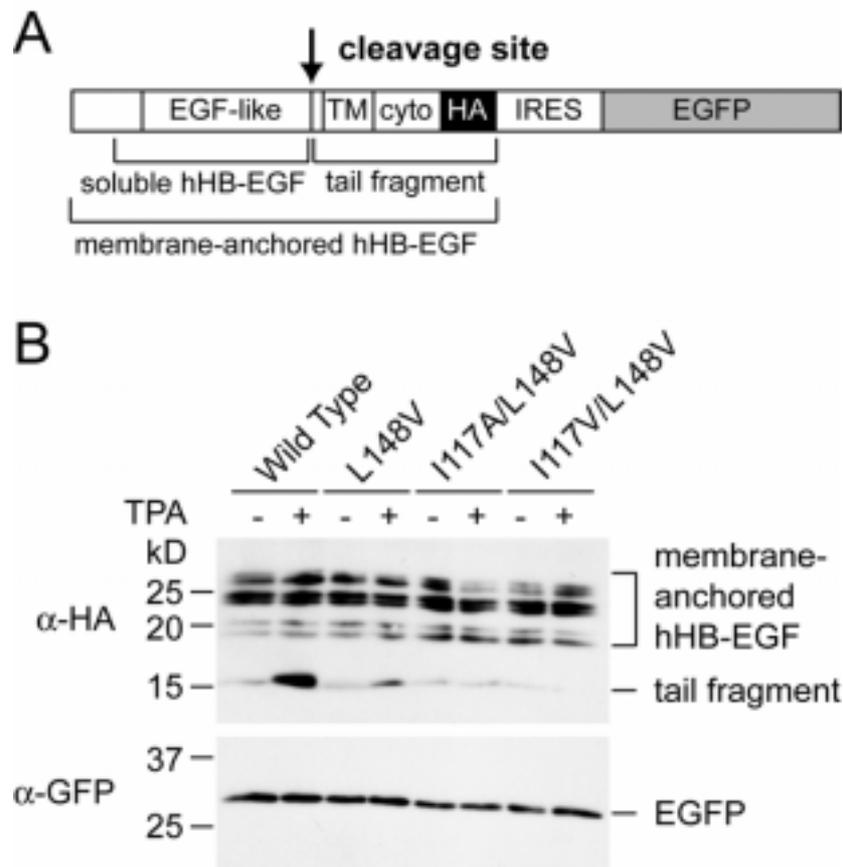


図 1-25 膜結合型ヒト HB-EGF の切断確認

A. ここで用いたヒト HB-EGF の構造の模式図

トランスメンブレンドメイン (TM) と細胞質ドメイン (cyto) からなるプロテアーゼによる切断断片を tail fragment と表している。

B. 細胞を無血清培地で 18 時間培養し, 64nM TPA を加えてさらに 30 分間培養した。そして膜結合型ヒト HB-EGF を抗 HA 抗体および抗 GFP 抗体を用いた Western Blot により調べた。EGFP は同じプラスミドから IRES 配列により発現させており, ローディングコントロールとして下のパネルに並べて示した。膜結合型ヒト HB-EGF の複数のバンドは, 様々な N 末端の切断や糖鎖修飾を表している。

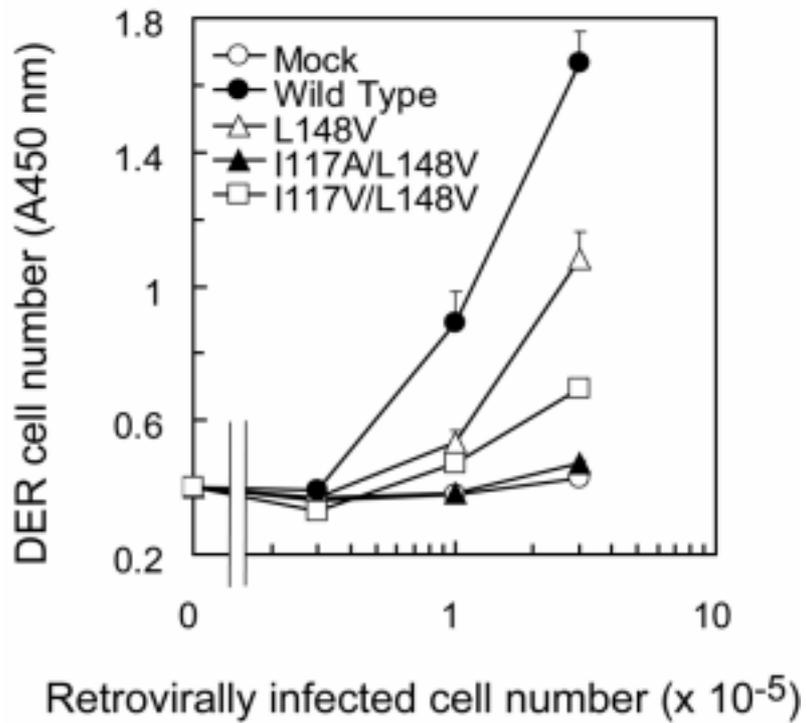


図 1-26 膜結合型ヒト HB-EGF の増殖因子活性

レトロウイルスによりヒト HB-EGF 変異体を発現させたマウス NIH 3T3 細胞を 12 ウェルプレートへ調整し、10% ホルマリンで固定した。その上で、DER 細胞 ( $1 \times 10^5/2\text{ml}$ ) と共に 36 時間培養した。その後、DER 細胞をピペッティングにより 96 ウェルプレートへ移し、生細胞数測定試薬を加えて 3 時間培養した後、DER 細胞の細胞数を測定した。値は 4 つの実験の平均で、バーは標準誤差を示す。

## (2-2) トランスジェニックマウスを用いた解析

### トランスジーン構築と培養細胞での解析

新たに作製した2つの変異型ヒト HB-EGF (I117A/L148V および I117V/L148V) について、マウス個体で用いた時の有用性を調べた。これまでに、野生型 HB-EGF を全身で発現するトランスジェニックマウスは出生後に発現誘導する方法を用いなければ得ることができず、胎児期の HB-EGF の過剰発現は致死となる可能性が報告されていた (Cha et al., 2003)。そこで、全身で遺伝子を発現させるプロモーターを用いて、野生型、I117A/L148V と I117V/L148V 変異型のそれぞれのヒト HB-EGF を発現するトランスジェニックマウスが得られるかどうかを調べることで、マウス個体で用いた時の有用性を検証した。

ここではトランスジーン発現確認を容易にするために、GFP 遺伝子を融合させた。これまでに、GFP 融合ヒト HB-EGF 遺伝子を導入したマウス細胞の DT 感受性は、野生型ヒト HB-EGF を導入したマウス細胞と変わらないことを確認している (図 1-27, 古川修士論文 2003)。そこで、GFP 遺伝子を融合させたそれぞれのヒト HB-EGF 遺伝子をニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターにつないだプラスミドを構築し (図 1-4D)、高いトランスフェクション効率を得られる Hela 細胞へリン酸カルシウム法により導入して発現確認を行った。その結果、それぞれのプラスミドを導入した細胞から GFP 蛍光が確認された (図 1-28A)。この蛍光は、EGFP を単独で発現させた細胞 (pEGFP-N1) よりも弱かったが、一般的に、膜タンパク質と融合させた時の GFP 蛍光は弱くなることが知られている。またこの時の細胞抽出液を調整し、Western Blot によりタンパク質の発現を確認した。その結果、3種類のプラスミドを導入した細胞抽出液ではすべて、予想された位置に GFP 融合タンパク質が検出され、HB-EGF/GFP 融合遺伝子が発現していることが確認された (図 1-28B)。

### トランスジェニックマウスの作製

培養細胞で GFP 融合タンパク質の発現が確認されたので、それぞれ 100 匹程度ずつのマウスが誕生するまで、C57BL/6J  $\times$  C57BL/6J の受精卵へトランスジーンインジェクションを行った。そして、誕生したマウスの中のトランスジーンが導入されたマウスがいるかどうかを、Southern Blot または PCR により調べた (data not shown)。その結果、野生型ヒト HB-EGF 遺伝子をもつトランスジェニックマウス (CAGTR1/GFP) では、合計 1843 個の受精卵へ 12 回インジェクションを行い、103 匹誕生し、9 匹 (2F1, 3F5, 4F2, 5M1, 7F1, 8M5, 10F2, 11M3, 12F1) でトランスジーン導入が確認された。I117A/L148V 変異型ヒト HB-EGF 遺伝子をもつトランスジェニックマウス (CAGTR5/GFP) では、合計

1468 個の受精卵へ 9 回インジェクションを行い,95 匹誕生し,19 匹(1M4,3F3,3F6,3M4,3M9,3M10,3M11,4F1,4F3,6F1,6F6,6M1,6M5,7M1,7M5,8F3,9M5,9M6,9M7)でトランスジーン導入が確認された。I117V/L148V 変異型ヒト HB-EGF 遺伝子をもつトランスジェニックマウス(CAGTR6/GFP)では,合計 1885 個の受精卵へ 9 回インジェクションを行い,111 匹誕生し,20 匹(1F1,1M1,3F1,3F6,3F9,3M5,6F1,7F1,7M1,9F1,9F4,9F10,9F16,9M1,9M2,9M3,9M5,9M9,9M11,9M12)でトランスジーン導入が確認された(表 1-3)。

### トランスジーン発現確認

ここで作製したトランスジェニックマウスは,ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターを用いていることにより,血液中の細胞においてもトランスジーンが発現されると考えられる。そこで,ファウンダーマウスの血液から RNA を回収し,血液中でのトランスジーン発現の有無を RT-PCR により調べた。その結果,血液中の細胞でトランスジーン発現が確認されたマウスは,CAGTR1/GFP マウスでは 7 匹中 2 匹(3F5,11M3)しか得られなかった。2F1 と 5M1 のマウスは,Tail Cut 後に死亡したため血液を採取できなかった(原因は不明)。それに対して,CAGTR5/GFP マウスと CAGTR6/GFP マウスではそれぞれ,19 匹中 14 匹(1M4,3F6,3M10,3M11,4F1,4F3,6F1,6F6,6M1,6M5,7M1,7M5,8F3,9M6)と 20 匹中 17 匹(1F1,1M1,3F1,3F6,3F9,3M5,6F1,7F1,7M1,9F1,9F10,9F16,9M1,9M2,9M3,9M9,9M12)ずつ得られ,トランスジーンを発現したマウスが得られた割合は高かった(図 1-29)。

次にトランスジーン発現について,他の組織での発現の有無を調べた。ここでは,血液細胞でトランスジーン発現が確認されなかったファウンダーマウスから組織(脾臓,脳,肝臓,脾臓,腎臓,小腸,精巣,肺,心臓,胸腺,筋肉)を回収し,細胞抽出液を調整し,トランスジーン由来のタンパク質の有無を Western Blot により調べた(図 1-30)。CAGTR1/GFP マウスは 4 匹調べ,8M5 では精巣のみで,10F2 では腎臓のみでトランスジーン発現が見られたが,7F1 と 12F1 では全く発現が見られなかった(図 1-30A)。CAGTR5/GFP マウスは 5 匹調べ,3F3 と 3M4 では全く発現が見られず,9M5 では心臓のみで発現が見られたが,3M9 ではいくつかの組織(脾臓,脳,精巣,心臓,筋肉)で発現が見られ,9M7 では調べたすべての組織で発現が見られた(図 1-30B)。

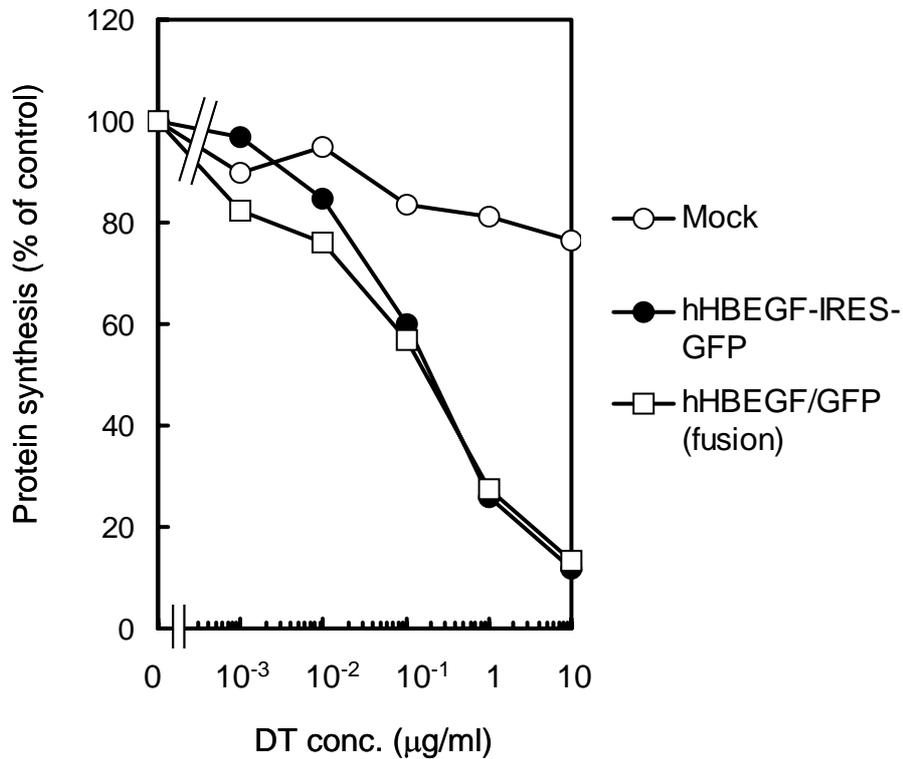
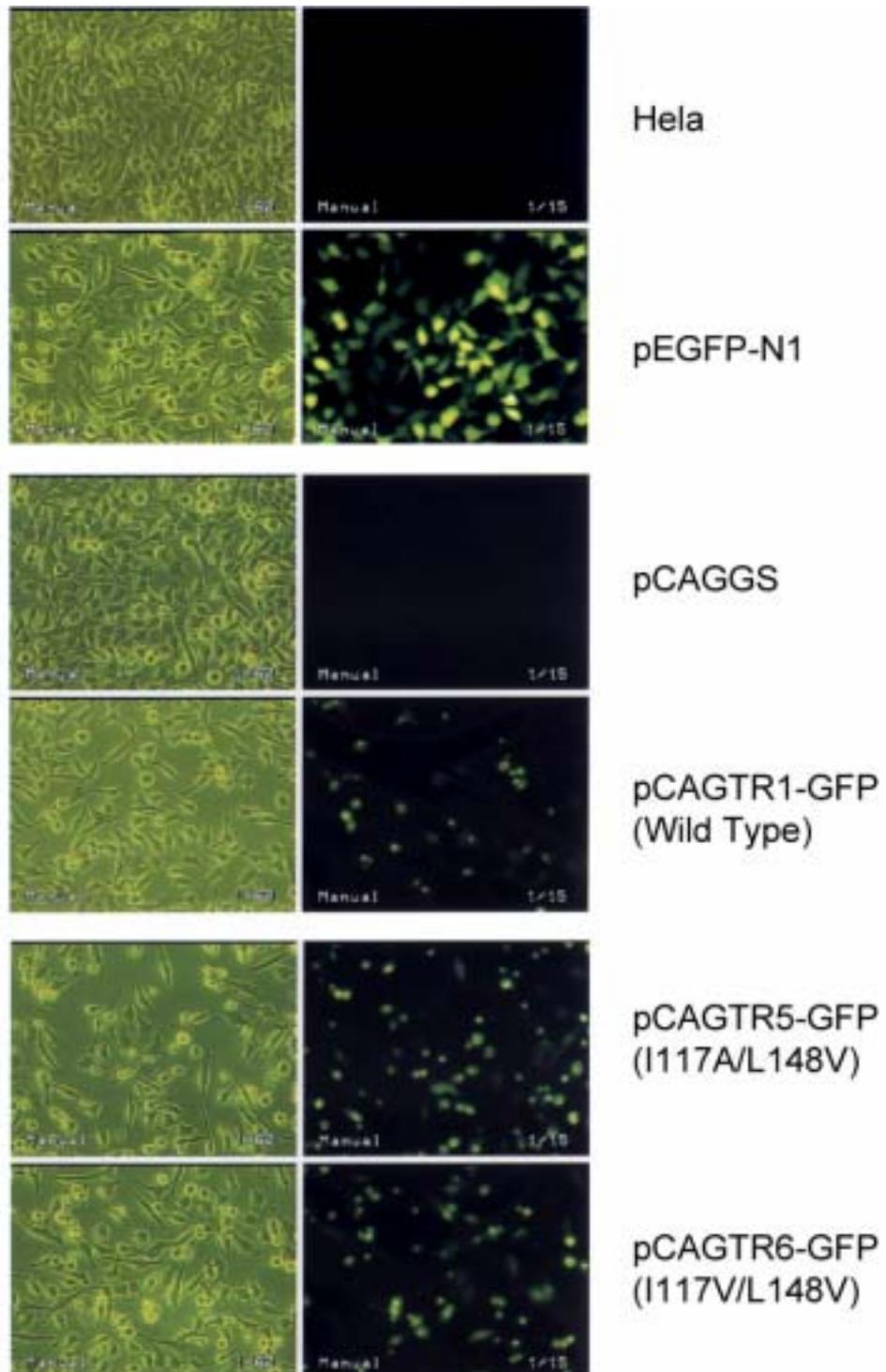
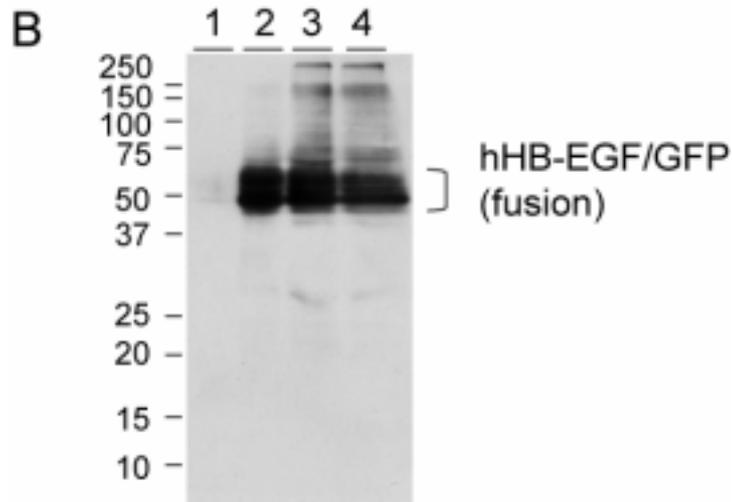


図 1-27 GFP 融合型ヒト HB-EGF 発現細胞の DT 感受性

GFP 融合型ヒト HB-EGF の DT 感受性を野生型 HB-EGF と比較した。野生型ヒト HB-EGF は IRES 配列により GFP を同時に発現させた。各遺伝子を含むウイルス溶液を 10mI (5ml × 2 回感染させた) 加えて培養したマウス NIH 3T3 細胞へ、種々の濃度の DT を加えて 37 °C で 12 時間培養後、<sup>35</sup>S ラベル化 Met/Cys を 1 時間取り込ませ、タンパク質合成量を測定した。横軸は DT を培地に加えた時の最終濃度 (μg/ml)。縦軸は DT 無添加時のタンパク質合成量を 100% として、タンパク質合成量の程度を % 表示した。

A





- 1: pCAGGS  
 2: pCAGTR1-GFP (Wild Type)  
 3: pCAGTR5-GFP (I117A/L148V)  
 4: pCAGTR6-GFP (I117V/L148V)

図 1-28 HeLa 細胞へ導入した時の GFP 蛍光と Western Blot

A. GFP 遺伝子を融合させたそれぞれのヒト HB-EGF 遺伝子をニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターにつないだプラスミドを構築し,高いトランスフェクション効率を得られる HeLa 細胞へリン酸カルシウム法により導入して 48 時間後に GFP 蛍光を観察した。pCAGGS は空ベクター, pEGFP-N1 は, CMV (cytomegarovirus) プロモーターの下流で EGFP を単独で発現させるプラスミド (clontech) を導入した細胞を示す。

B. この時の細胞抽出液を各レーンに 10 $\mu$ g ずつ泳動し,Western Blot によりタンパク質の発現を確認した。プラスミドの発現確認は,ヒト HB-EGF 抗体を用いて行った。

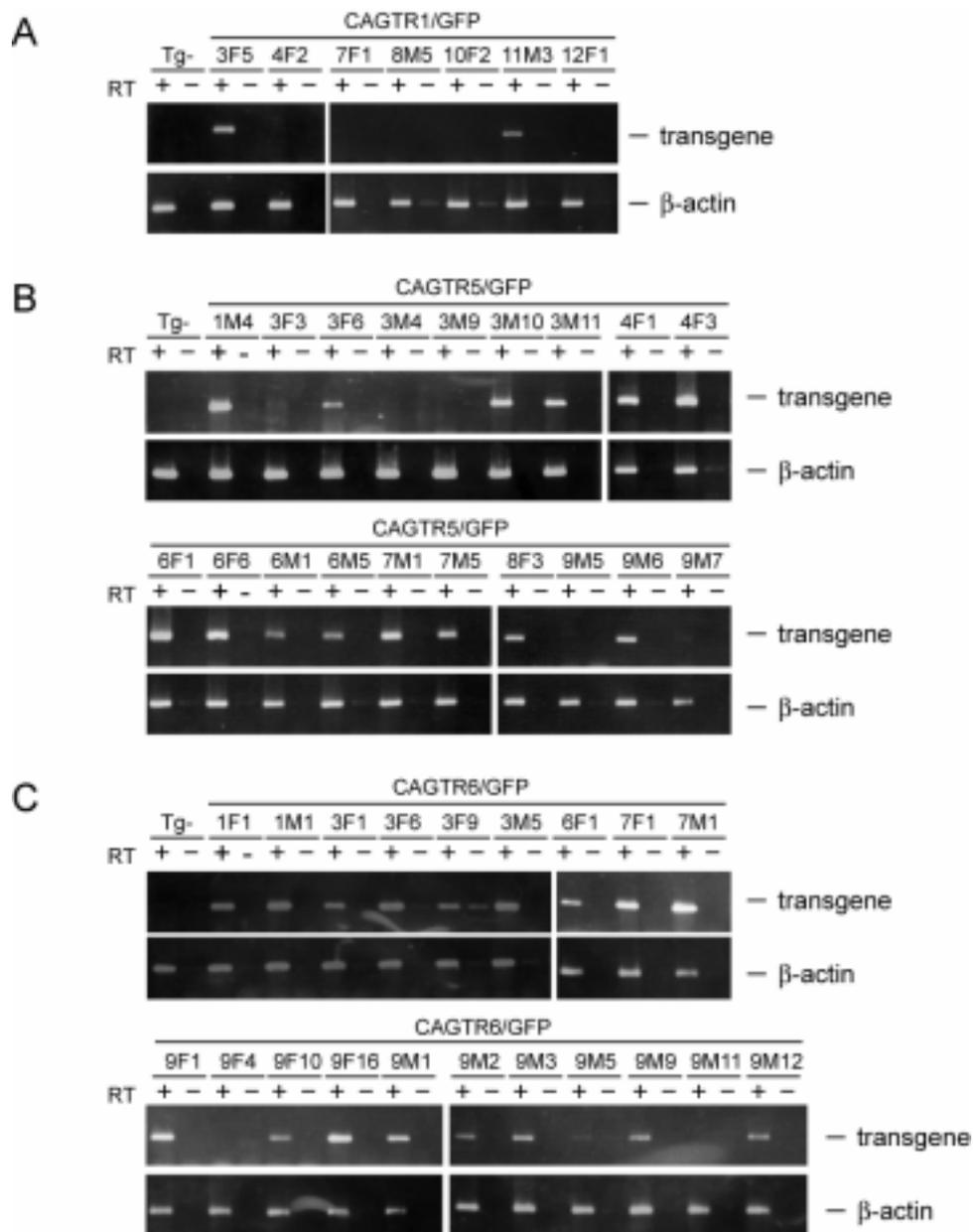
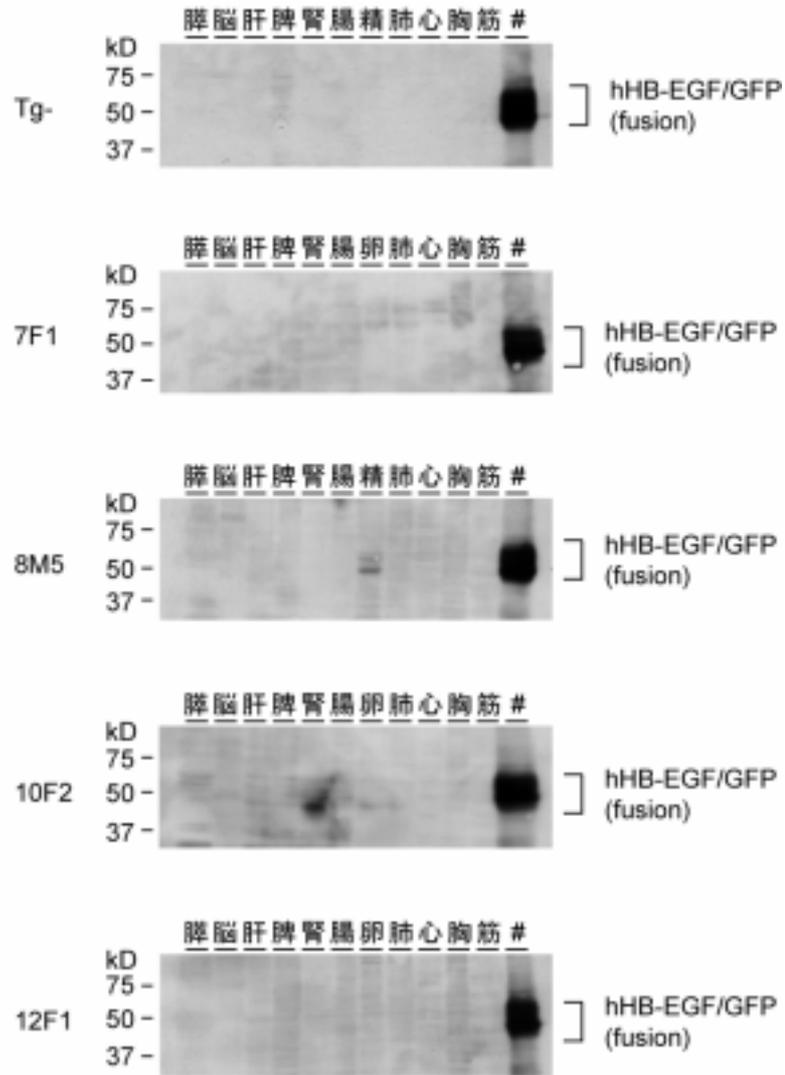


図 1-29 血液由来 RNA の RT-PCR

ファウンダーマウスの血液から RNA を回収し、トランスジーンの発現を RT-PCR により調べた。RT+と-は、cDNA を得るための逆転写反応液中へ加えた逆転写酵素の有無を示している。

- A. AlbTR1/GFP ( Wild Type ) のマウス、
- B. AlbTR5/GFP ( I117A/L148V ) のマウス
- C. AlbTR6/GFP ( I117V/L148V ) のマウス

A



CAGTR1/GFP (Wild Type)

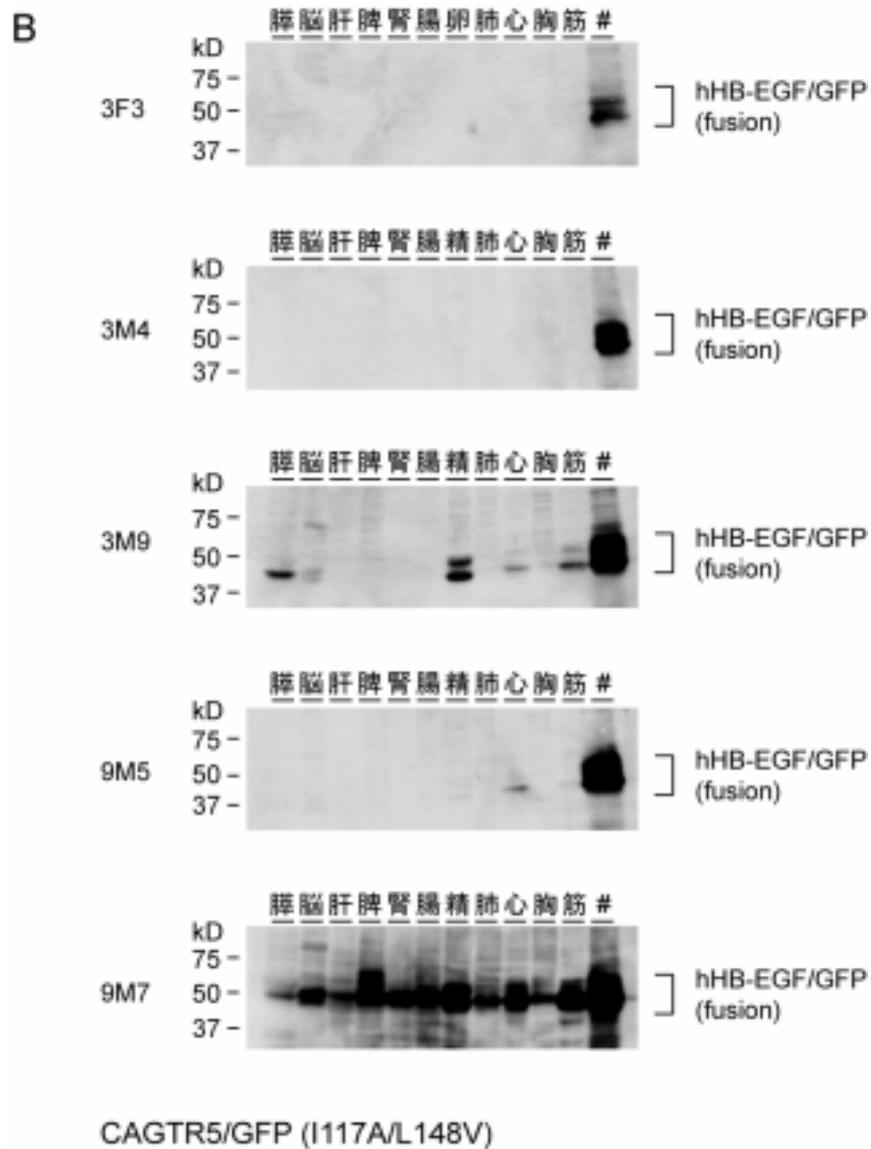


図 1-30 マウス組織の Western Blot

マウス組織から調整したタンパク質を各レーンに 10 $\mu$ g ずつ泳動し, Western Blot によりトランスジーンの発現を調べた。

A. AlbTR1/GFP ( Wild Type ) のマウス

B. AlbTR5/GFP ( I117A/L148V ) のマウス

トランスジーン ( HB-EGF/GFP ) の発現は, ヒト HB-EGF 抗体を用いて検出した。

組織の表記は以下の通り, 脾: 脾臓, 脳: 大脳, 肝: 肝臓, 脾: 脾臓, 腎: 腎臓, 腸: 小腸, 精: 精巣, 肺: 肺, 心: 心臓, 胸: 胸腺, 筋: 筋肉。

## CAGTR1/GFP (Wild Type)

	Injection		Tail Cut			Tg+			Tg+マウス名
	日付	卵数			計			計	
1	060302	181	1	6	7	0	0	0	
2	060303	239	5	2	7	1	0	1	(2F1)
3	060309	195	5	3	8	1	0	1	<b>3F5</b>
4	060314	154	4	7	11	1	0	1	4F2
5	060511	134	0	3	3	0	1	1	(5M1)
6	060518	123	5	3	8	0	0	0	
7	060519	107	2	1	3	1	0	1	7F1
8	060525	150	11	8	19	0	1	1	8M5
9	060526	100	0	2	2	0	0	0	
10	060601	96	3	4	7	1	0	1	10F2
11	060608	188	7	6	13	0	1	1	<b>11M3</b>
12	060609	176	9	6	15	1	0	1	12F1
計		1843	52	51	103	6	3	9	9/103 ( 8.7 % )

## CAGTR5/GFP (I117A/L148V)

	Injection		Tail Cut			Tg+			Tg+マウス名
	日付	卵数			計			計	
1	060323	189	5	5	10	0	1	1	<b>1M4</b>
2	060331	138	2	4	6	0	0	0	
3	060406	148	7	11	18	2	4	6	3F3, <b>3F6</b> , 3M4, 3M9, <b>3M10</b> , <b>3M11</b>
4	060714	200	3	2	5	2	0	2	<b>4F1</b> , <b>4F3</b>
5	060721	172	7	3	10	0	0	0	
6	060728	99	6	5	11	2	2	4	<b>6F1</b> , <b>6F6</b> , <b>6M1</b> , <b>6M5</b>
7	060804	150	4	8	12	0	2	2	<b>7M1</b> , <b>7M5</b>
8	060810	149	4	1	5	1	0	1	<b>8F3</b>
9	060818	223	8	10	18	0	3	3	9M5, <b>9M6</b> , 9M7
計		1468	46	49	95	7	12	19	19/95 ( 20.0% )

## CAGTR6/GFP (I117V/L148V)

	Injection		Tail Cut			Tg+			Tg+マウス名
	日付	卵数			計			計	
1	060407	222	5	4	9	1	1	2	<b>1F1, 1M1</b>
2	060420	113	4	3	7	0	0	0	
3	060427	316	9	8	17	3	1	4	<b>3F1, 3F6, 3F9, 3M5</b>
4	060616	154	4	9	13	0	0	0	
5	060622	188	6	3	9	0	0	0	
6	060629	155	3	5	8	1	0	1	<b>6F1</b>
7	060706	253	3	9	12	1	1	2	<b>7F1, 7M1</b>
8	060824	251	0	0	0	0	0	0	
9	060831	233	20	16	36	4	7	11	<b>9F1, 9F4, 9F10, 9F16 , 9M1, 9M2, 9M3, 9M5, 9M9, 9M11, 9M12</b>
計		1885	54	57	111	10	10	20	20/111 ( 18.0 % )

表 1-3 ヒト HB-EGF 全身発現マウスの解析結果

Tg+マウス名の項目で、括弧をつけたマウスは、Tail Cut 後に死亡し血液中でのトランスジーンの発現確認を行えなかったマウス、太字で大きく示したマウスは、血液中でのトランスジーンの発現が確認されたマウスを示している。各表の右下には、Tail Cut したマウス数に対する Tg+マウス数の割合を載せた。卵数は、トランスジーンをインジェクションした受精卵の数を示している。

## 考察

### 肝炎モデルマウスを用いた解析

L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF は、膜結合型 HB-EGF の機能として報告されている増殖抑制効果が見られなかったことより (図 1-8), プロテアーゼによる切断に耐性を持つだけでなく, EGF 受容体との結合活性も失っていると判断した (古川修士論文 2003)。そのため, L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF 遺伝子をアルブミンエンハンサー/プロモーターの下流につなげて, 肝炎モデルトランスジェニックマウスを作製し, 解析を行った。まず Alb-TR1 6M2 と Alb-TR2 1M11 のマウスを用いて DT 感受性の違いを比べたが, 500ng/kg と 50ng/kg の DT 投与では血液中の GPT 活性に大きな違いは見られなかった (図 1-11)。続けて 50-500ng/kg の間の濃度で比較を行うことも検討したが, 同じラインのマウスでも GPT 活性の上昇の程度に個体差が出てしまうことや, ヒト HB-EGF の発現量が同じでないことを考慮し, DT 投与による感受性に大きな違いが出なければ, 2つのヒト HB-EGF の毒素受容体機能を比べるのは困難であると判断した。次に, Alb-TR1 と Alb-TR2 の初代培養の肝細胞の増殖速度を比較することで, L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF 発現細胞の評価を試みた。しかし, ポジティブコントロールとなる Alb-TR1 6M2 Tg<sup>+</sup>のマウスから調整した肝細胞の DNA 合成量は, ネガティブコントロールとなる Tg<sup>-</sup>のマウスから調整した細胞と顕著な差は見られなかった。このような結果となった要因としては, 前提となった実験 (kiso et al., 2003) に用いられたマウスは ICR の系統で作製された Tg16 であるのに対して, ここで用いたマウスの系統は C57BL/6J であったこと, あるいは肝臓での Alb-TR1 6M2 のヒト HB-EGF の発現量は, Alb-TR1 の調べた 3 ライン (6M2, 7M4, 7M5; 発現比は 1.0 : 0.8 : 0.4, data not shown) の中では最も多かったが, Tg16 の 4 分の 1 程度 (data not shown) でありヒト HB-EGF の発現量が少なかったことが挙げられる。また, 論文 (kiso et al., 2003) で報告された通りマウス個体で肝切除を行い, その後の肝実質細胞の増殖を調べることも考えられたが, 初代培養の肝実質細胞を用いた実験で優位な差が見られなかったことより, マウス個体で肝切除を行っても同様の結果になる可能性を考え, 断念した。さらに初代培養の肝細胞で, TPA 刺激の有無によって DT 感受性に違いが見られるかどうかを調べたが (図 1-13), 初代培養の肝細胞は TPA が効かない, または膜結合型 HB-EGF を切断する機構がない可能性が考えられ, この実験系で比較を行うことはできなかった。また, L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF を発現した細胞をホルマリンで固定し, 膜結合型の増殖因子活性を測定したところ, EGF 受容体との結合活性は失っていないことが示唆された (図 1-17B)。よって

これらの結果を考慮し、肝炎モデルマウスを用いた解析は、これ以上行わなかった。

#### 膜結合型 HB-EGF の増殖抑制効果

ヒト HB-EGF の増殖因子活性測定に用いた DER 細胞は、ヒト HB-EGF 発現細胞数に依存して増殖するが、分泌型ヒト HB-EGF の量が多い時は減少した（図 1-16A, C）。この結果より、膜結合型 HB-EGF による増殖抑制効果を調べる実験系（図 1-7）の再検証を行った。その結果、分泌型発現細胞と共に培養した時も、DER 細胞の増殖抑制効果は見られた（図 1-16B）。よって、この増殖抑制効果は膜結合型の機能ではなく、分泌型の機能によるものであることが示された。論文の報告（Iwamoto et al., 1999）と異なった理由としては次のことが挙げられる。岩本らは、HB-EGF 発現細胞と DER 細胞の間を膜で区切り、DER 細胞には分泌された HB-EGF のみ作用できる条件で得られた結果を分泌型 HB-EGF の機能、HB-EGF 発現細胞と DER 細胞の間の膜がなく、膜結合型 HB-EGF が DER 細胞に作用できる条件で得られた結果を膜結合型 HB-EGF の機能として比較を行っている。そして、前者の膜で区切った時には DER 細胞のアポトーシスが見られなかったことより、後者の条件で見られた DER 細胞のアポトーシスは膜結合型 HB-EGF によって引き起こされた結果であると結論づけている（図 1-7）。しかし膜で区切った条件で同様の実験を行ったところ、DER 細胞に取り込まれた  $^3\text{H}$ チミジンの放射活性（ $\sim 5 \times 10^2 \text{cpm}$ ）は、ヒト HB-EGF を発現していない時（ $\sim 1 \times 10^2 \text{cpm}$ ）よりも上昇していたが、膜結合型 HB-EGF による抑制効果を調べた時（図 1-8, 1-16B）に得られた放射活性（ $2.5 \times 10^4 \text{cpm}$ ）に比べ低い値を示し、膜を通過した分泌型ヒト HB-EGF の量は少ない可能性が示唆された。この結果より、膜で区切った時に DER 細胞のアポトーシスが見られなかったのは、DER 細胞に作用した分泌型ヒト HB-EGF の量が少なすぎたことが原因である可能性が考えられた。

#### 新たな変異型ヒト HB-EGF のアミノ酸置換部位

L148S/P149T 変異型ヒト HB-EGF では、EGF 受容体との結合活性が残っていることが示唆された。そのため、新たな変異型ヒト HB-EGF の探索を行った。

ヒト HB-EGF の Ile<sup>117</sup> に対応するヒト EGF の Leu<sup>15</sup> のアミノ酸残基を置換すると、EGF 受容体との親和性が減少することが報告されていた。例えば、Val と Ala への置換はそれぞれ、野生型の 18%と 2.7%まで親和性の減少が見られている（Campion et al., 1994）。この報告を元にしてヒト HB-EGF のアミノ酸置換を行ったところ、I117V の変異ではヒト HB-EGF の増殖因子活性にあまり影響を与えなかったが、I117A の変異では大幅な減少が見られた。一方、ヒト HB-EGF

の結晶構造解析では, Ile<sup>117</sup> は DT と相互作用していないと報告されていた(Louie et al., 1997)。しかしながら, I117A または I117A/L148A の変異体では導入したマウス細胞の DT 感受性が低下しており, ヒト HB-EGF の構造が I117A の変異によってわずかに変わっている可能性が考えられた。次に, ヒト EGF の Leu<sup>15</sup> のアミノ酸置換は EGF 受容体との親和性に大きく影響を与えており (Campion et al., 1994), ヒト HB-EGF の Leu<sup>148</sup> への変異は増殖因子活性の大幅な減少が期待された。またヒト EGF の結晶構造解析より, Leu<sup>15</sup> は EGF 受容体と疎水的に相互作用しており (Ogiso et al., 2002), このアミノ酸残基が EGF 受容体との結合に重要な働きをしていることが示唆された。しかしながら, ヒト HB-EGF の Leu<sup>148</sup> への変異は, 増殖因子活性の大幅な減少は見られなかった。この結果は, ヒト HB-EGF の EGF 様ドメインは Leu<sup>148</sup> で終わっているが, 対応するヒト EGF は 53 個のアミノ酸からなり (図 1-21A), Leu<sup>15</sup> の C 末端には 6 個のアミノ酸残基を含んでいることに起因している可能性が挙げられる。さらにヒト EGF の変異体解析で, ヒト EGF で変異を組み合わせると EGF 受容体との親和性がさらに減少していたが (Campion et al., 1994), これと同様に, I117A/L148V のような二重変異は, ヒト HB-EGF の増殖因子活性のさらなる減少をもたらした。また Val<sup>124</sup> と Arg<sup>128</sup> のアミノ酸残基置換は, 増殖因子活性に影響を与えず, Tyr<sup>138</sup> の変異は DT 感受性に影響を与えた。よってこれらの結果を合わせると, ヒト HB-EGF の DT 受容体機能を失わずに増殖因子活性を抑えるためには, Ile<sup>117</sup> と Leu<sup>148</sup> のアミノ酸置換が効果的であった。分泌型ヒト HB-EGF を DT 解毒剤として利用するために行われた別グループによる研究では, I117A/L148A の変異を持つ分泌型ヒト HB-EGF の組み換えタンパク質は, 低い増殖刺激活性を持っていたが DT 結合阻害活性は野生型と似ていたことが示されている (Cha et al., 2002)。

#### 非切断変異型ヒト HB-EGF

L148S と L148S/P149T のヒト HB-EGF 変異体は, TPA やリゾフォスファチジル酸などの刺激で促進される切断に抵抗を示すことが報告されている (Hirata et al., 2001; Yamazaki et al., 2003)。このことは, Leu148 への変異は膜結合型の切断に影響を与える可能性を示しており, 実際, L148V のヒト HB-EGF 変異体では, TPA 刺激による切断の減少が見られた。分泌型ヒト HB-EGF は DT 受容体として機能しないので, 膜結合型ヒト HB-EGF の切断を抑えれば, ヒト HB-EGF 発現マウス細胞の DT 感受性の減少を防ぐことが期待された。しかしながら, ヒト HB-EGF の L148V 変異体を発現させたマウス細胞の DT 感受性は野生型を発現した細胞に比べてそれほど高くはなかった。このことは, 図 1-25B で見られるように, TPA 刺激後もヒト HB-EGF の膜結合型が多く残っていることに起因すると考えられる。一方, 培養細胞において膜結合型 HB-EGF は生物学的な活性

を持っていると考えられているが (Higashiyama et al., 1995), 膜結合型 HB-EGF の機能として報告されている増殖抑制効果は, 上述のように分泌型による機能であることが確認された。さらに膜結合型 HB-EGF の切断ができない変異マウスは, HB-EGF ノックアウトマウスと似た表現形を示しており (Yamazaki et al., 2003), 膜結合型 HB-EGF の生理機能は不明である。また, 過剰量の分泌型 HB-EGF を産出する変異マウスは皮膚や心臓で深刻な異常を示しており (Yamazaki et al., 2003), 分泌型が HB-EGF 機能に重要な役割を果たしていることが示されている。さらに, 膜結合型 HB-EGF を切断する ADAM12 メタロプロテアーゼ阻害剤によって心肥大が阻害された (Asakura et al., 2002)。ここでは, TPA 刺激に耐性を示す L148V 変異を含むヒト HB-EGF 変異体は, 分泌型と膜結合型の両方を含む活性を測定した時の方が, 膜結合型のみの活性を測定した時に比べて, 大幅な増殖因子活性の減少が見られた。それゆえ, トランスジェニックマウスでのヒト HB-EGF 過剰発現の副作用は, 膜結合型 HB-EGF の切断を抑えることで防ぐことが期待される。

#### TRECK 法に用いる毒素受容体の候補

I117A/L148V のヒト HB-EGF 変異体は, 分泌型と膜結合型の増殖因子活性が減少しており, DT 受容体機能を保持していた。しかしながら, 感染マウス細胞の DT 感受性, すなわち ED<sub>50</sub> は, 野生型に比べて 1/10 程度に減少していた。野生型マウスでは 500 $\mu$ g/kg の DT を投与すると, 1 週間以内に半数が死亡するが, その 1/10 の 50 $\mu$ g/kg の DT 投与では影響は見られない (Pappenheimer et al., 1982)。そこで, この 50 $\mu$ g/kg を野生型マウスに影響がない最大の DT 濃度としても, 例えば肝臓障害モデルでは, 5-500ng/kg のように, トランスジェニックマウスへの DT 投与量は, 一般的に低いと考えられる。また, TRECK 法を用いた時の細胞傷害効果は, DT の投与量とトランスジェニックマウスでのヒト HB-EGF 発現量に依存するが, ヒト HB-EGF の発現レベルは組織ごとのプロモーター活性に依存する (Saito et al., 2001)。このことより, 1/10 程度の DT 感受性の低下は, TRECK 法の応用にとって無視できると考えられる。しかし, ヒト HB-EGF の発現が低い時や細胞に傷害を与えるのに多量の DT が必要とされる時は, I117V/L148V のヒト HB-EGF 変異体が適しているかもしれない。なぜなら, I117V/L148V のヒト HB-EGF 変異体を感染させた細胞の DT 感受性は, 野生型とほとんど変わりなく, 分泌型を含む増殖因子活性は減少が見られたからである。I117V/L148V のヒト HB-EGF 変異体は, 分泌された増殖因子活性はわずかしか減少していなかったが, この変異体は膜結合型の切断刺激に抵抗を示した。そこで上述したように, 実際の生理条件下では, 図 1-21 の実験条件下に近く, 図 1-24 と図 1-26 で見られた増殖因子活性はほとんどの場合において考慮しなくてもよいと考え

られる。

### ヒト HB-EGF 全身発現マウスを用いた解析

野生型ヒト HB-EGF を発現する CAGTR1/GFP マウスが誕生したことはこれまでの報告とは異なった。しかしながらトランスジェニックマウスは同じプロモーターを用いても，受精卵に導入されるトランスジーン的位置やコピー数によって発現する組織や量が異なることは多く，細胞にとって有害な働きをする遺伝子を発現するトランスジェニックマウスが得られることはありうる。例えば，プラスミノゲンを活性化することで血栓を融解する作用を持つプラスミンを誘導することで細胞に有害な働きをするウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを，アルブミンエンハンサー/プロモーターを用いて肝臓で発現するトランスジェニックマウスでは，56 匹のトランスジーンを持つファウンダーマウスが誕生し，トランスジーンが発現していると考えられる 17 匹は出生後 3 日以内に死亡しているが，残りの 39 匹のマウスの中からトランスジーンを発現しているマウスが 2 ライン得られている (Heckel et al., 1990)。また，ヒト HB-EGF を用いたトランスジェニックマウスの報告の中には，全身で遺伝子を発現させる CMV プロモーターを用いて，腎臓，肝臓，肺，胃の 4 つの組織で発現しているマウスの報告例がある (Provenzano et al., 2005)。

ここではトランスジーンが発現確認を行うために，ファウンダーマウスの血液から RNA を回収して調べたが，血液中の細胞でトランスジーンが発現が見られなかったマウスについては，他の組織での発現の有無を調べた (図 1-30)。その結果，調べた 9 匹中 4 匹はどの組織においてもトランスジーンが発現が見られず，3 匹は 1 箇所の組織でのみ発現が見られ，トランスジーンは血液中での発現の有無と他の組織での発現の有無はおおむね一致していると考えられる。この時 CAGTR5/GFP の 9M7 ではすべての組織で発現が見られたが CAGTR1/GFP マウスでは，このように多くの組織で発現していたマウスは調べた限りでは得られていない。

一方，CAGTR5/GFP と CAGTR6/GFP のマウスでは，血液中でトランスジーンが発現が確認されたマウスは，それぞれ 14 匹と 17 匹で，CAGTR1/GFP マウスの 2 匹に比べ多かった。トランスジーンを導入した受精卵から生まれ，Tail Cut を行ったマウスの中で，トランスジーンが発現が血液中で確認されたマウス数の割合を比べると，CAGTR5/GFP と CAGTR6/GFP のマウスではそれぞれ 14.7% と 15.3% であるのに対して，CAGTR1/GFP マウスの 1.9% に比べ高かった ( $p < 0.01$ ，表 1-4)。このことより，増殖因子活性が減少していた I117A/L148V または I117V/L148V の変異型ヒト HB-EGF は，胎児期の過剰発現による致死性を回避できると考えられる。よって，これらの変異型ヒト HB-EGF をトランスジーン

として用いれば，トランスジェニックマウスが得られる可能性が高くなることが期待される。

#### まとめ

当研究室で開発した TRECK 法は，毒素遺伝子を標的細胞へ発現させるような従来のトランスジェニックマウスを用いた細胞ノックアウト法と比較すると，トランスジーンを発現させただけでは個体に影響を与えない点が特徴と言えよう。実際，アルブミンエンハンサー/プロモーターを用いて肝実質細胞へヒト HB-EGF を発現させたトランスジェニックマウスでは，通常の飼育条件下で異常は見られなかった (Saito et al., 2001)。しかし，TRECK 法に用いるヒト HB-EGF は，序論で述べたように，生体内で様々な働きをしていることが示唆されている増殖因子である。そのため，ヒト HB-EGF を過剰発現させる組織によっては，マウス個体へ異常を生じる可能性は排除できず，細胞ノックアウトを行うためのトランスジェニックマウスが得られない可能性も残っている。そこで，DT 受容体機能を保持しつつ，ヒト HB-EGF の増殖因子活性を取り除くことを試みた。ヒト HB-EGF の様々な変異体を作製し，培養細胞へ導入して解析を行ったところ，I117A/L148V と I117V/L148V の 2 つの有効な変異体を得ることに成功した。またこれらの遺伝子を全身で発現するトランスジェニックマウスの作製を行ったところ，これらの変異体を発現するトランスジェニックマウスが得られる可能性が高いことを示唆する結果が得られた。よって，これらの変異体をトランスジーンとして用いることで，細胞ノックアウトを行うトランスジェニックマウスに異常を生じる可能性を取り除き，トランスジーンを発現させただけでは個体に影響を与えないという特徴をもつ TRECK 法を用いた細胞ノックアウトが広く行われるようになると考えられる。そのことにより，様々な細胞の生理機能の理解や新たな疾患モデルマウスの作製による治療法の開発が進むことを期待したい。

	マウス	数	割合	有意差
Tg+率	TR1	9/103	8.7%	P < 0.05
	TR5	19/95	20.0%	
	TR1	9/103	8.7%	P < 0.1
	TR6	20/111	18.0%	
発現率 (Tg+ 数に対して)	TR1	2/7	28.6%	P < 0.1
	TR5	14/19	73.7%	
	TR1	2/7	28.6%	P < 0.05
	TR6	17/20	85.0%	
発現率 (Tail Cut 数に対して)	TR1	2/103	1.9%	P < 0.01
	TR5	14/95	14.7%	
	TR1	2/103	1.9%	P < 0.01
	TR6	17/111	15.3%	

表 1-4 ヒト HB-EGF 全身発現マウスの統計学的解析結果

トランスジーンが導入されたマウスが得られた割合，および血液中でトランスジーンが発現が確認されたマウスが得られた割合をまとめた。後者の割合については，Tg+マウスの中で調べた数に対する割合と，トランスジーンをインジェクションした受精卵から誕生し，Tail Cut を行ったマウス数に対する割合の両方の比較を行った。有意差は，参考資料で示した手順に従って求め，両側検定の値で判定を行った。

## 第 2 部

### 脳細胞を標的とした TRECK 法の応用

## 序論

動物個体内の特定の細胞のみを任意の時期に除去するために、第 1 部の序論で述べたように、当研究室において TRECK 法を開発した。そして、この TRECK 法を用いて、肝実質細胞や膵臓ランゲルハンス島β細胞特異的に障害を与えた、肝炎モデルマウスや糖尿病モデルマウスを作製することに成功した (Saito et al., 2001; 齊藤博士論文 2005)。しかし、脳内の細胞を標的として TRECK 法を用いることが可能であるかどうかについては、まだ検討の余地がある。すなわち、TRECK 法では、血液中に投与した DT が血液の循環によって細胞表面のヒト HB-EGF に到達することで、標的細胞を除去する。しかし脳毛細血管と脳細胞の間には血液脳関門 (Blood Brain Barrier, BBB) と呼ばれる障壁があることが知られている。この BBB は、高分子や水溶性分子の透過を制限することにより、毒性物質が脳内に侵入することを防ぐ働きや、脳細胞周囲の細胞環境 (浸透圧, pH や電解質濃度など) を維持する働きをしていると考えられている (Rubin et al., 1999; Pardridge et al., 2002 など)。この BBB の存在により、脳細胞を標的として TRECK 法を用いる時は、58kDa の大きさのタンパク質である DT が BBB を通過できるかどうかの問題となる。

一方、生体内において、脳神経系は高次生命活動に重要な役割を担っており、脳神経系を構成する個々の細胞機能を解明することは、高次生命活動の理解や、関連する疾患の治療法の開発に役立つことが期待される。そのため、脳神経系の細胞においても、特定の細胞を除去する様々な取り組みがこれまでに行われている。1 つ目は、DT 遺伝子を脳組織特異的なプロモーター下で発現させる方法である。この方法は、第 1 部の序論でも述べたように細胞を除去する時期をコントロールできないという問題があり、Cre-loxP のシステムを共に用いたとしても (Brockschneider et al., 2004)、Cre タンパク質の発現時期をコントロールする必要が生じる。2 つ目は、ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ (HSV1-TK) を毒素遺伝子の代わりに用いて、オリゴデンドロサイトを特異的に除去する方法である (Mathis et al., 2000; Jalabi et al., 2005)。HSV1-TK 遺伝子が発現した細胞に ganciclovir (GCV) などの核酸類似体を投与すると、核酸類似体が HSV1-TK の働きによって有害物質に変換され、その結果 DNA 合成障害が引き起こされ細胞は死に至る。この方法では、HSV1-TK 遺伝子が発現しただけでは細胞は死なず、核酸類似体を任意の時期に投与することで、細胞死を引き起こす時期をコントロールできる。しかしながら、障害を与えられる細胞は分裂中の細胞に限られ、ニューロンのようなほとんど分裂しない細胞を除去するためには用いることができないという問題がある。3 つ目の例として、イムノト

キシンを用いて任意の時期にニューロンに障害を与えた例が挙げられる (kobayashi et al., 1995 ; Watanabe et al., 1998 ; Kaneko et al., 2000 )。これはヒトインターロイキン 2 受容体 $\alpha$  (ヒト IL-2R) をニューロン特異的に発現したトランスジェニックマウスを作製し, ヒト IL-2R 抗体と毒素の融合タンパク質であるイムノトキシンを任意の時期にその個体へ投与することにより障害を与える方法である。このイムノトキシンを用いる方法では, 分裂しない細胞を除去する時にも有効であるが, 上述の BBB の存在のため, イムノトキシンは脳室内へ直接投与している。しかしながら, マウスの脳室内への投与には特殊な脳固定装置と熟練した外科的な技術が必要となり, 簡便な方法とは言えない。また, この方法には, 細胞を除去するために必要なイムノトキシンの濃度と野生型マウスに影響のある濃度の幅が 10-50 倍程度しかないという問題もある。

そのような中, 低分子人工化合物を用いた新たな細胞ノックアウト法が報告された (Mallet et al. 2002 )。この方法では, 細胞死の実行因子であるカスパーゼ 3 を膜に結合させ不活性型の状態で発現させる遺伝子 (M-Fv2-Casp3) を導入した細胞へ, 任意の時期に人工化合物 (AP20187) を加えると, 不活性化されていたカスパーゼの多量体形成が誘導され細胞死が引き起こされる。この方法を用いて, 肝臓特異的に M-Fv2-Casp3 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスを作製すると, AP20187 を投与した時のみ劇症肝炎様症状が誘発されることが示された。この方法で細胞死を誘導するために用いられる AP20187 は分子量が約 1kDa の脂溶性化合物であり, BBB を通過できることが期待された。そこで当研究室では, この方法を Chemical Inducer of Dimerization (CID) 法と名づけ, 中枢神経系のミエリンを構成するタンパク質の 1 つである myelin basic protein (MBP) 遺伝子のプロモーターを用いて, 脳細胞を特異的に除去することを試みた。その結果, トランスジーンを導入が確認されたマウスは 9 匹誕生したにもかかわらず, M-Fv2-Casp3 遺伝子を脳細胞で発現したトランスジェニックマウスは得られなかった。さらに, ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターのように強い活性をもつプロモーターを用いて M-Fv2-Casp3 遺伝子を導入した培養細胞ではコロニー形成数の減少が見られ, AP20187 非存在下でも細胞死が起こる可能性が示唆された。このため CID 法は, 活性が強いプロモーターを用いた場合にはトランスジーンを発現したマウスが得られないという問題がある可能性が考えられた (河原修士論文 2005 )。

このように, これまでに脳細胞を特異的に除去するための有効な細胞ノックアウト法は見出されていなかった。しかし, BBB を透過する物質の性質については未だ不明な点が多く, DT が BBB を透過すると考えられる報告もある (Wrobel et al., 1990 )。また TRECK 法で用いるヒト HB-EGF 遺伝子は, 強い活性を持つプロモーターを用いて培養細胞に導入しても, M-Fv2-Casp3 遺伝子で見

られたような細胞毒性を引き起こす現象は見られず、トランスジェニックマウスが得られやすい点において、TRECK 法は CID 法よりも優れていることが考えられた（河原修士論文 2005）。さらに、脳内に侵入するウエストナイルウイルスの BBB 透過メカニズムを解明した報告では、ウエストナイルウイルスが感染したマウスの体内では、Toll like receptor 3 (TLR3) によって自然免疫系が活性化されることで BBB の透過性が高まり、ウエストナイルウイルスが脳内へ侵入することが示された。またこの報告では、ウエストナイルウイルスと同じ二本鎖 RNA に類似した合成化合物のポリイノシンポリシチジン酸 (polyinosinic-polycytidylic acid, polyIC) をマウスの腹腔内へ投与すると、ウエストナイルウイルス感染時と同様に、BBB の透過性が高まることも示された (Wang et al., 2004)。他にも BBB の透過性に異常が生じたノックアウトマウスの報告例が存在しており (Nitta et al., 2003), BBB の透過性を人為的に調節できる可能性も考えられる。一方、他の研究グループより、TRECK 法を用いて脳内の細胞を特異的に除去できる可能性を示唆する報告がなされているが (Buch et al., 2005; Gropp et al., 2005; Luquet et al., 2005), これらの報告ではマウスに投与した DT の量が多いことなど、脳内の細胞を標的として TRECK 法を用いることが可能であるかどうかについては、まだ疑問の余地がある。よって、これらの状況をあわせると、TRECK 法を用いて脳細胞を特異的に除去することが可能であるかどうかを改めて検証することや、BBB の透過性に影響を及ぼす化合物との併用などにより、TRECK 法を用いた脳細胞除去法を確立することが必要であると判断した。

そのため、オリゴデンドロサイト特異的に遺伝子を発現する MBP プロモーターを用いてその検証を行うことを考えた。オリゴデンドロサイトは中枢神経系内に存在するグリア細胞の一種で、神経細胞の軸索を取り巻くミエリン鞘を形成している (Baumann et al., 2001)。このミエリン鞘が絶縁体の役割を果たし、電気信号を迅速に伝達することが可能となる。このため、ミエリン鞘が傷害を受けると、神経の電気信号の伝達遅延や信号の遮断が発生する。これまでもウイルス感染や化学的傷害を与えることで脱ミエリン化を引き起こした脱髄疾患モデル動物や、トランスジェニックマウスを用いた方法などにより、数多くの脱ミエリンモデル動物が存在しており、これらのモデルでは、振戦やてんかん発作、発育遅延などの症状が現れることが報告されている (Jalabi et al., 2005 の Introduction を参照)。このことより、オリゴデンドロサイトを標的細胞として検証を行えば、障害を与えた時の影響を評価しやすいことが利点として考えられる。そこで、MBP 遺伝子のプロモーターを用いて、ヒト HB-EGF 遺伝子をオリゴデンドロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、DT 投与によりオリゴデンドロサイトを特異的に除去することが可能であるか

どうかを検証した。

## 材料と方法

### MBP-HBEGF マウスの作製, genotyping, Northern Blot

MBP プロモーターは, M-Fv2-Casp3 遺伝子発現マウスの作製を試みた際に使用したものと同じで (河原修士論文 2005), 木村穰氏から供与して頂いた, pMPV302 プラスミド (NAIST 河野研ストック No.685) に挿入されたものを用いた。この MBP プロモーターの下流にヒト HB-EGF 遺伝子 (野生型) が挿入されたプラスミド (pMBP-HB-EGF, NAIST 河野研ストック No.751) を, *Kpn* I と *Not* I で切り出し, 精製された断片をトランスジーンとして利用し, 誕生したファウUNDERマウスの genotyping までを, 当研究室の河原が行った。

F1 世代以降の genotyping は, 第 1 部の材料と方法【PCR 法による genotyping】の項に記した, Alb-TR1/Alb-TR2 マウスと同じ, HBEGF550F と AlbTR2103R のプライマーを用いた PCR により行った。MBP-HBEGF マウスの Northern Blot は, 第 1 部の材料と方法【Northern Blot】の項に記した方法で行った。ただし, マウス MBP 遺伝子の発現確認は, 次の方法で得た cDNA 断片を用いて行った。

図 2-1 で調整した Tg-マウスの小脳から回収した RNA に対して, 第 1 部の材料と方法【血液由来 RNA の RT-PCR】の項に記した方法と同様に cDNA を得た。この cDNA を鋳型として, 5-MBPv1-Bam と 3-MBPv1-Xho のプライマーを用いて, 0.2 $\mu$ l の Pyrobest DNA polymerase (TaKaRa; R005B) を 50 $\mu$ l の反応系に加え, (1) 96 3 分, (2) 96 30 秒, 55 30 秒, 72 1 分を 35 サイクル (3) 72 10 分, 4 保存の条件で, PCR を行い, 増幅された産物を精製した後, *Bam* HI と *Xho* I で切り出して, pBluescriptII SK(-) の *Bam* HI と *Xho* I の制限酵素部位へ挿入してプラスミドを得た。MBP 遺伝子には 6 種類の Spliced Variant が存在し, DNA シークエンサーを使用して配列を確認したところ, 3, 4, 6 の Variant を持つプラスミドが得られた。このうち, Variant 3 を持つプラスミドから *Bam* HI と *Xho* I で切り出して精製した断片からプローブを作製した。ここで用いたプライマーの配列を以下に記した。

5-MBPv1-Bam : 5'- CGC GGA TCC ATG GCA TCA CAG AAG AGA CC -3'

3-MBPv1-Xho : 5'- CCG CTC GAG TCA GCG TCT CGC CAT GGG AG -3'

### HE 染色

マウスをトリプロモエタノールにて麻酔し, 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。組織を取り出し, 同じ固定液を用いて一晩固定した後, 30%スクロースに置換した。O.C.T.コンパウンド中で凍結後, クライオスタットにて 8mm の切片を作製した。コンパウンドを水道水で洗い流し, ヘマトキシリン

(WAKO ; 131-09665)へ5-10分間浸した後、水道水で流水水洗した。70% EtOHへ5分、85% EtOHへ5分、92.5% EtOHへ5分、96% EtOHへ5分、100% EtOHへ5分浸した後、エオジン(WAKO ; 050-06041)を加えて1分浸し、70% EtOHと100% EtOHで洗い流し、Hemo-De(藤沢薬品工業)へ5分間、2回浸し、マウントクイック(大道産業)を用いて封入し、Nicon COOLSCOPEにて観察を行った。

### 免疫組織染色法

上述した方法で作製した組織切片を、PBS でコンパウンドを洗い流した後、PBST/NGS(0.2% Tween 20 ,5% Normal goat serum in PBS)にて30分 blocking を行い、一次抗体を用いて室温で2時間反応を行った。PBST/NGSで3回洗い、二次抗体で室温1時間反応させた。PBSで洗浄した後、VECTA Shield with DAPI(Vector)を用いて封入、Zeiss 蛍光顕微鏡(Axiophoto)にて観察を行った。CNPaseの検出には、Mouse monoclonal 抗体(11-5B, Chemicon ; MAB326, 100倍希釈で使用)を、GFAPの検出には、Rabbit Polyclonal 抗体(DAKO ; N1506, 原液で使用)を、1次抗体として使用した。2次抗体は、それぞれ anti-mouse IgG Cy3 と anti-rabbit Cy3 (Jackson) を500倍希釈で用いた。

### BBBの透過性

Evans Blue (Wako ; 056-04061, 4% w/v in PBS で遮光をして4 保存)は、1% w/v となるようにPBSで希釈し、マウスの腹腔内へ投与した。二本鎖RNA類似合成化合物, poly IC(Polyinosinic-polycitidylic acid sodium salt, Sigma ; P0913-10MG, 10mg/ml in PBS を少量に分注して-30 保存, 再凍結不可)は、PBSで希釈し、マウスの腹腔内へ投与した。脳組織は、マウスをトリプロモエタノールにて麻酔し、4%パラホルムアミドを用いて灌流固定した後に取り出して、実体顕微鏡下で撮影した。

### 初代培養神経細胞の調整

妊娠14日のICRマウスから胎仔を取り出して、実体顕微鏡下で終脳部分を分離した。そして、bFGF(R&D ; 233-FB, 10µg/ml in 0.1% BSA/PBSで4 保存, 終濃度10ng/mlで使用直前に添加)を含むN2/DMEM/F12培地[DMEM/F12培地(Sigma ; D8437)に、25µg/ml インスリン(Sigma ; I1882), 100µg/ml アポトランスフェリン(Sigma ; T1147), 20nM プロゲステロン(Sigma ; P0130, in EtOH, -20 保存), 100µM プトレッシン(Sigma ; S5261), 30nM 亜セレン酸 Na(Sigma ; S5261, in H<sub>2</sub>O, 4 保存), 100単位/ml ペニシリン(明治製菓)と100µg/ml ストレプトマイシン(明治製菓)を添加]に懸濁させ、オルニチン(Sigma ; P3655)/フィブロネクチン(Invitrogen)コートした24ウェルプレートにまき4日間培

養した。このプレートへ様々な濃度の DT を加えて 6 時間培養し、<sup>35</sup>S ラベル化 Met/Cys を含む培地で 1 時間培養し、第 1 部の材料と方法【培養細胞の DT 感受性測定】の項で記した方法で DT 感受性を調べた。

## 結果

### MBP-HBEGF トランスジェニックマウス

MBP プロモーターの下流にヒト HB-EGF (野生型) を接続したトランスジーンを, C57BL/6J × C57BL/6J の受精卵にマイクロインジェクションし, 誕生したマウスにトランスジーンが導入されているかどうかを, Southern Blot により調べた。その結果, 8 匹 (1F1, 2F4, 2F6, 2F9, 2M6, 2M7, 3M3 と 3M6) のマウス (MBP-HBEGF トランスジェニックマウス) でトランスジーンが導入が確認された (以上は当研究室の河原が行った, data not shown)。そのうち F1 世代で Tg+ 個体が誕生した 5 ライン (1F1, 2F4, 2F6, 2M7, 3M3) について, 組織 (大脳, 小脳, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺) から RNA を回収し, Northern Blot によりヒト HB-EGF の発現を調べた。その結果, 1F1, 2F4, 2M7, 3M3 のラインでは, 大脳と小脳でのみヒト HB-EGF の発現が確認された。2F6 のラインでは, 1 回目に調べた個体 (\*1) では, どの組織においてもヒト HB-EGF のバンドが見られなかったが, 2 回目に調べた別の個体 (\*2) では大脳と小脳でのみバンドが確認された。よって, 調べた 5 ラインのうち, すべてのラインで脳組織特異的にトランスジーンが発現が確認された (図 2-1A)。次に, この 5 ラインについて, 大脳と小脳でのヒト HB-EGF の発現量を比べた。その結果, 大脳と小脳のどちらの組織においても, 1F1 が最もヒト HB-EGF の発現量が多く, 3M3 が次に多かった。残りの 3 ライン (2F4, 2F6, 2M7) は, ヒト HB-EGF の発現量は少なかった (図 2-1B)。

### DT 腹腔内投与後の脳組織切片の観察

初めに, トランスジェニックマウスの腹腔内へ DT を投与した時の影響を調べた。ここでは, F1 世代で最も早く, 多くの Tg+ 個体が得られた MBP-3M3 のラインを用いて実験を行った。野生型マウスでは, 500 $\mu$ g/kg の DT を投与すると, 1 週間以内に半数が死亡するが, その 1/10 の 50 $\mu$ g/kg の DT 投与では影響は見られない (Pappenheimer et al., 1982)。そこで, この 50 $\mu$ g/kg を野生型マウスに影響がない最大の DT 濃度とし, MBP-3M3 マウス (Tg+/-, 各 2 匹ずつ) の腹腔内へ投与した。しかし, 肝炎モデルマウス [第 1 部, 結果 (1-1)] で肝障害が現れ始める DT 投与後 2-3 日目では, Tg+ マウスの外観に影響は見られず, 引き続き DT 投与を 3 日おきに行った。その後, 4 回目の DT 投与時から体重の減少が見られたため, 最初の投与から 13 日目後にマウスの脳を固定し凍結切片を作製した。

まず, 脳組織切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色して観察した。その結果, MBP-3M3 の Tg+ マウスでは, DT 投与を行った 2 匹とも, 大脳皮質や

海馬などに著しい障害が観察された。また小脳においても障害の痕跡が観察された。Tg-マウスでは、DT 投与を行った 2 匹とも、このような障害は見られなかった (図 2-2)。

次に、この脳組織を免疫組織染色法により観察した。その結果、Tg+マウスの小脳において標的としたオリゴデンドロサイトのマーカーである 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNase) の減少が確認された。しかし、HE 染色で著しい障害が見られた大脳皮質や海馬においては、CNase の減少は認められなかった (図 2-3A)。

さらに標的細胞以外の細胞への DT 投与の影響を調べるために、アストロサイトのマーカーである Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) の抗体を用いて、同様に免疫組織染色法により脳組織を観察した。その結果、Tg+と-のすべてのマウスの脳組織で、GFAP の減少は見られなかった (図 2-3B)。したがって、これらの結果を合わせると、マウスの血液中に投与した DT は、特別な処置を行わなくても BBB を通過し、標的とした脳内のオリゴデンドロサイト特異的に障害を与えたことが示唆された。

#### DT 投与後の BBB 透過性

MBP-3M3 マウスへの DT 投与実験より、血液中に投与した DT は BBB を通過することが考えられた。一方、序論で述べたように、脳内に侵入するウエストナイルウイルスの BBB 透過メカニズムを解明した報告では、ウエストナイルウイルスと同様の性質を持つ polyIC をマウスの腹腔内へ投与すると BBB の透過性が高まることが示された (Wang et al., 2004)。そこで、この報告を手掛かりとして、DT をマウスへ投与すると、ウエストナイルウイルス感染時と同様に免疫系が活性化されることにより BBB の透過性が高まり、血液中の DT が脳内へ侵入する可能性を考えた。そのため、DT 投与後の BBB の透過性を、Evans Blue 試薬を用いて調べた。ここで用いた Evans Blue は、血液中に投与すると血清アルブミンと複合体を形成する。この Evans Blue とアルブミンの複合体 (MW 69 kDa) は、通常は BBB を通過できず、この試薬で脳組織内が染まれば BBB に異常があることが示される。

Wang らの実験では、野生型マウスの腹腔内へ polyIC を投与すると、24 時間後に脳組織が Evans Blue で染まっていた。そこでまず、高濃度 (50 $\mu$ g/kg と 500 $\mu$ g/kg) の DT と polyIC をマウスの腹腔内へ投与し、24 時間後に Evans Blue を腹腔内へ投与した。その後 1 時間経過した時にはマウスの全身が青色で染まっていたため、脳組織を固定し観察した。しかしながら、50 $\mu$ g/kg と 500 $\mu$ g/kg の DT 投与を行ったマウスの脳組織は、Evans Blue で染まらなかった。また、polyIC 投与を行ったマウスの脳組織も同様に染まらなかった (図 2-4A)。さらに、

Evans Blue の投与時期を、DT および polyIC 投与後 48 時間に変更しても、結果は同様であった(図 2-4B)。次に、DT または polyIC を Evans Blue と共にマウス腹腔内へ投与を行った。ここでは DT 投与量を 1 回あたり 10 $\mu$ g へ変更したが、マウスの体重は 20g 前後であり、体重あたりに換算すると 500 $\mu$ g/kg となる。異なる条件毎にそれぞれ 2 匹ずつのマウスを用いて実験を行ったが、1% Evans Blue を 1ml 投与し 24 時間経過した時には、半分のマウスは死亡した。この時に生き残ったマウスの脳組織を観察してみたが、Evans Blue による染色像は観察されなかった(図 2-4C)。1 回あたりの Evans Blue の量を減らして、DT または polyIC と共に 24 時間おきに 3 回腹腔内投与を行った後に脳組織を観察したが、Evans Blue による染色像は観察されなかった(図 2-4D)。

### DT 投与条件の検討

MBP-3M3 マウスへの DT 投与実験より、MBP-HBEGF トランスジェニックマウスでは、腹腔内への DT 投与により脳内の標的細胞へ障害を与えることが可能であると考えられるが、腹腔内へ投与する DT の量や、DT 投与後の脳内の標的細胞へ障害が現れる時期などは不明である。そこで、標的細胞へ障害を与えられる最適な DT 投与条件を簡便に探ることを試みた。ここでは、DT 投与により標的細胞が障害を受け減少すると、標的細胞特異的に発現するヒト HB-EGF や MBP 遺伝子の量が、脳組織全体で減少すると考えた。そこで、MBP-1F1 のマウスを用いて、高濃度(50 $\mu$ g/kg)の DT を 3 日おきにそれぞれ 1-5 回、マウスの腹腔内へ投与した後に大脳と小脳から RNA を回収し(図 2-5B)、Northern Blot によりヒト HB-EGF と MBP 遺伝子の発現量を調べた。

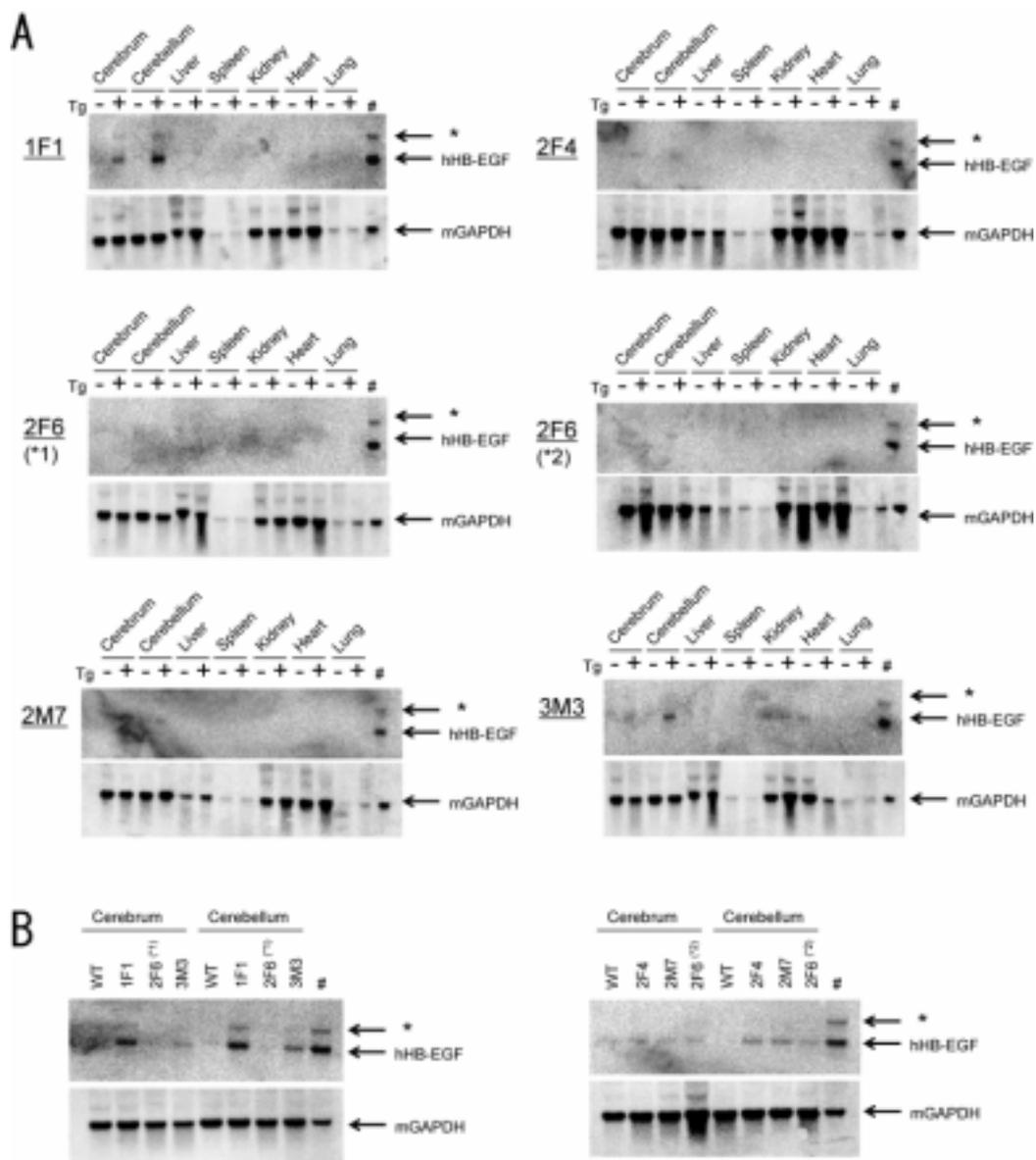
その結果、50 $\mu$ g/kg の DT を 1 回投与したマウスにおいても、小脳と大脳の両方で、ヒト HB-EGF の減少が見られ、DT を投与したすべての Tg<sup>+</sup>マウスでヒト HB-EGF 発現細胞が減少していることが示唆された。しかし、MBP 遺伝子をプローブとして同様の RNA で Northern Blot を行ったところ、ヒト HB-EGF のような減少は認められなかった(図 2-5A)。

### マウス神経細胞の DT 感受性

マウスやラットは DT 非感受性の動物であるが、DT を脳内に直接投与すると比較的少量の投与でも麻痺を起こして死ぬという報告がある(Pappenheimer et al., 1982)。TRECK 法は、野生型マウスの細胞が DT 非感受性であることを利用しており、標的細胞以外の細胞に対して DT が作用することは、標的的特異的に細胞を除去する際に問題を生じる可能性が考えられる。そこで、マウスの初代培養の神経細胞を調整し、脳内の細胞が DT 感受性であるかどうかを確認した。妊娠 14 日の ICR マウスから胎仔を取り出し、終脳部分を分離して 4 日間培養した後、

様々な濃度の DT を加えて 6 時間培養した時のタンパク質合成量を測定した。

その結果，ここで調整した神経細胞は，培地中へ加えた DT 濃度が増加するにしたがってタンパク質合成量の低下が見られ，DT 感受性を示した。このタンパク質合成量の低下は，DT 感受性が高い Vero 細胞に比べれば低かった。しかし，マウスの培養細胞である NIH 3T3 細胞では，ここで培地中へ加えた DT 濃度ではタンパク質合成量の低下はほとんど見られなかった（図 2-6）。



hHB-EGF/mGAPDH	1F1	2F4	2F6	2M7	3M3
Cerebrum ( 大脑 )	15	3	1	2	11
Cerebellum ( 小脑 )	5	1	1	1	3

## 図 2-1 MBP-HBEGF マウスの Northern-Blot

- A. トランスジーンを導入が確認されたマウスのうち F1 世代で Tg+個体が得られた 5 ライン (1F1, 2F4, 2F6, 2M7, 3M3) について, マウス (6-10 週齢) の組織 (大脳, 小脳, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺) から RNA を回収し, ホルマリン変性ゲルの各レーンに 10 $\mu$ g ずつ泳動し, Northern Blot によりヒト HB-EGF の発現確認を行った。「#」のレーンは, Tg16 (Saito et al., 2001) の肝臓から調整した RNA を, ポジティブコントロールとして泳動した。2F6 のラインは, 1 回目に調べた個体 (\*1) ではバンドが見られなかったが, 2 回目に調べた別の個体 (\*2) ではバンドが確認され, このラインもトランスジーンが発現していると判断した。ここで用いたヒト HB-EGF のプローブでは, 「\*」の位置のバンドは, 非特異的なバンドであると考えられる。
- B. A で調べた各ラインについて, 大脳と小脳におけるヒト HB-EGF の発現量の差を比べた。ここでは, マウス GAPDH の発現量で補正した発現比をその下の表に示した。表は, ポジティブコントロール (#, Tg16 肝臓) のバンドの量を基準として計算し, 大脳と小脳のそれぞれで最も発現量が低いラインの発現量を 1 として表示した。

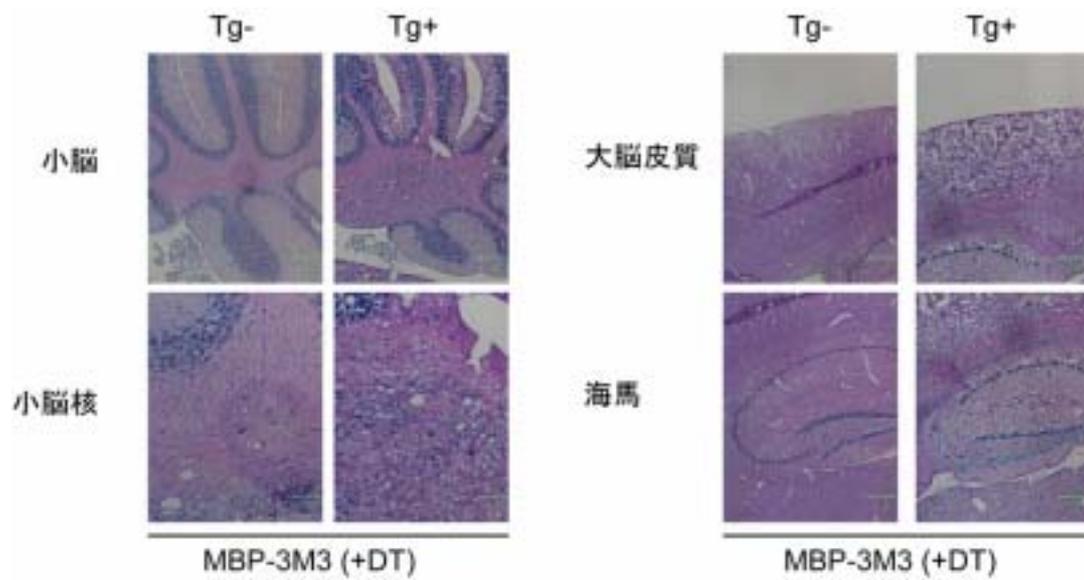
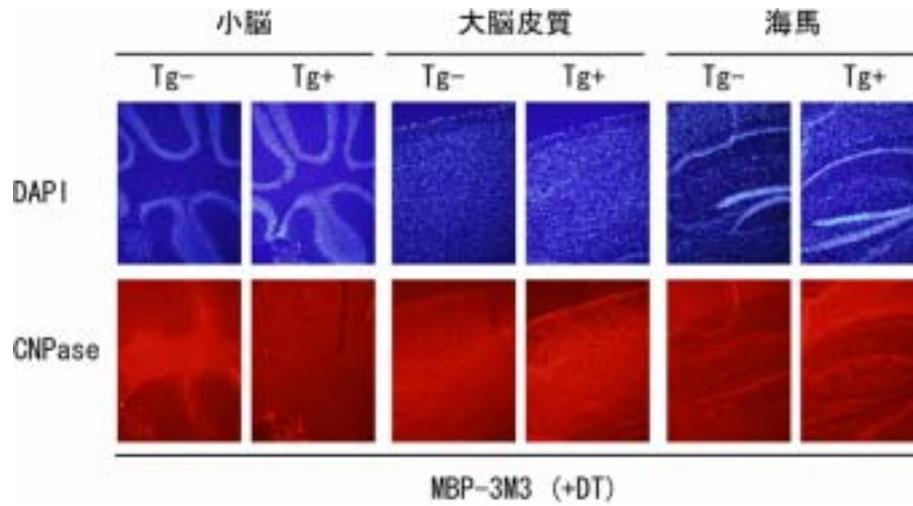


図 2-2 HE 染色による脳組織の観察

マウスの腹腔内へ高濃度の DT (50 $\mu$ g/kg) を 3 日おきに 4 回投与した後，最初の投与から 13 日後にマウスを固定した。その後，脳組織から凍結切片を作製し，HE 染色を行って観察した。MBP-3M3 マウスの Tg $\pm$ -それぞれ 2 匹ずつを用いて調べ，ここでは 1 匹ずつの結果を示す。

A



B

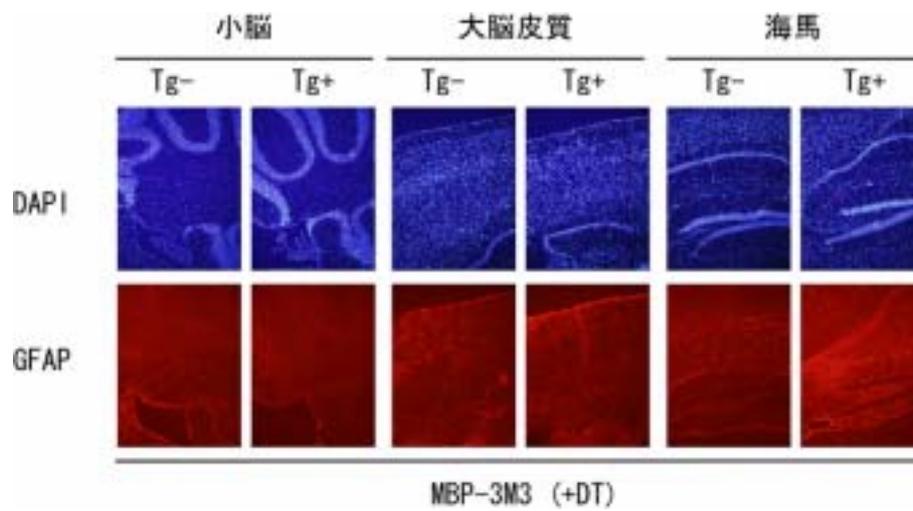


図 2-3 免疫組織染色法による脳組織の観察

図 2-2 の凍結切片について ,オリゴデンドロサイトのマーカータンパク質である CNPase 抗体と (A), アストロサイトのマーカータンパク質である GFAP 抗体を用いて (B), 免疫組織染色を行った。

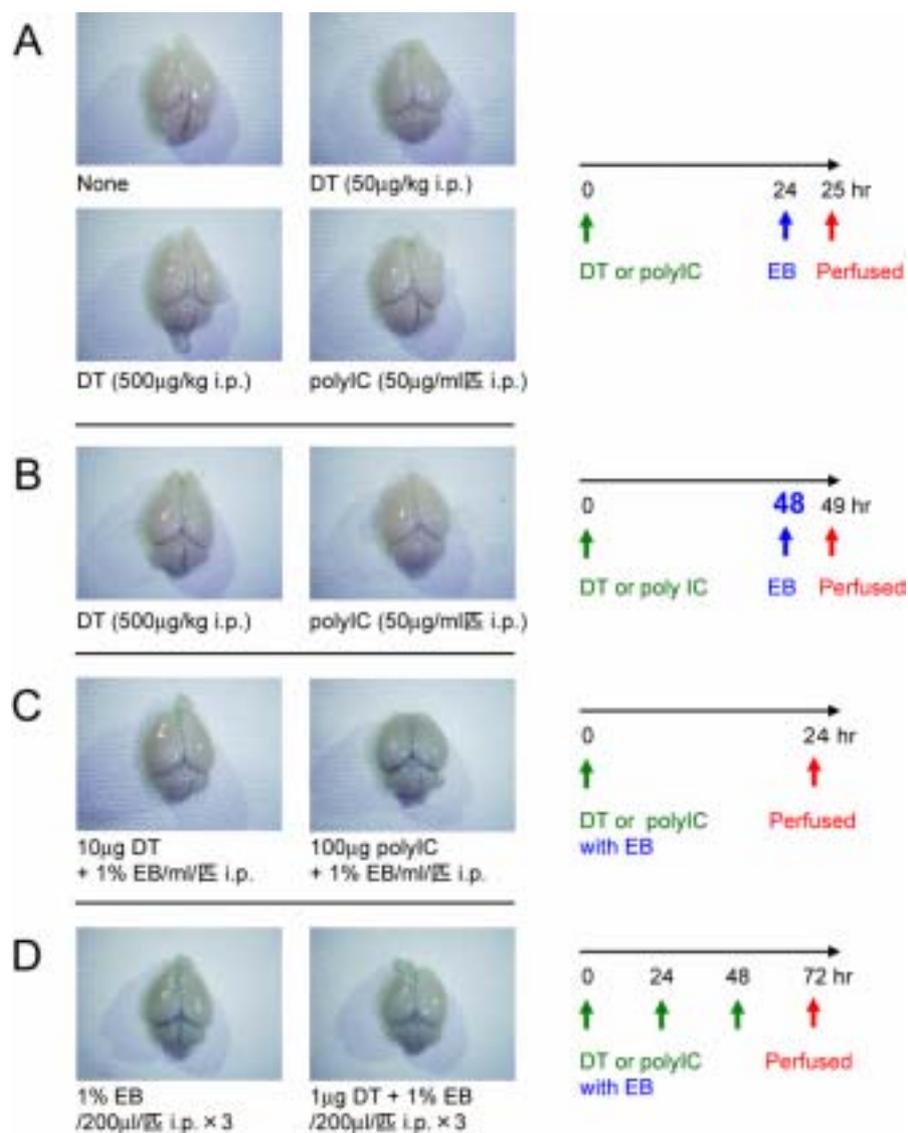


図 2-4 BBB の透過性

DT または polyIC を，8-12 週齢の野生型マウス（C57BL/6J）の腹腔内へ投与（i.p.）した時の BBB 透過性を，Evance Blue（EB）試薬を用いて調べた。

A-B. DT または polyIC を投与し 24 時間（A）または 48 時間（B）経過した後，EB を投与し，その 1 時間後にホルマリンで脳組織を固定し，観察した。

C. EB と共に DT または polyIC を投与し，24 時間後に脳組織を固定し，観察した。

D. C で行った投与を 24 時間ごとに 3 回行い，3 回目の投与から 24 時間後に脳組織を固定し，観察した。

脳組織の写真の右側には，実験開始時を 0 時間として実験の概略を示した。

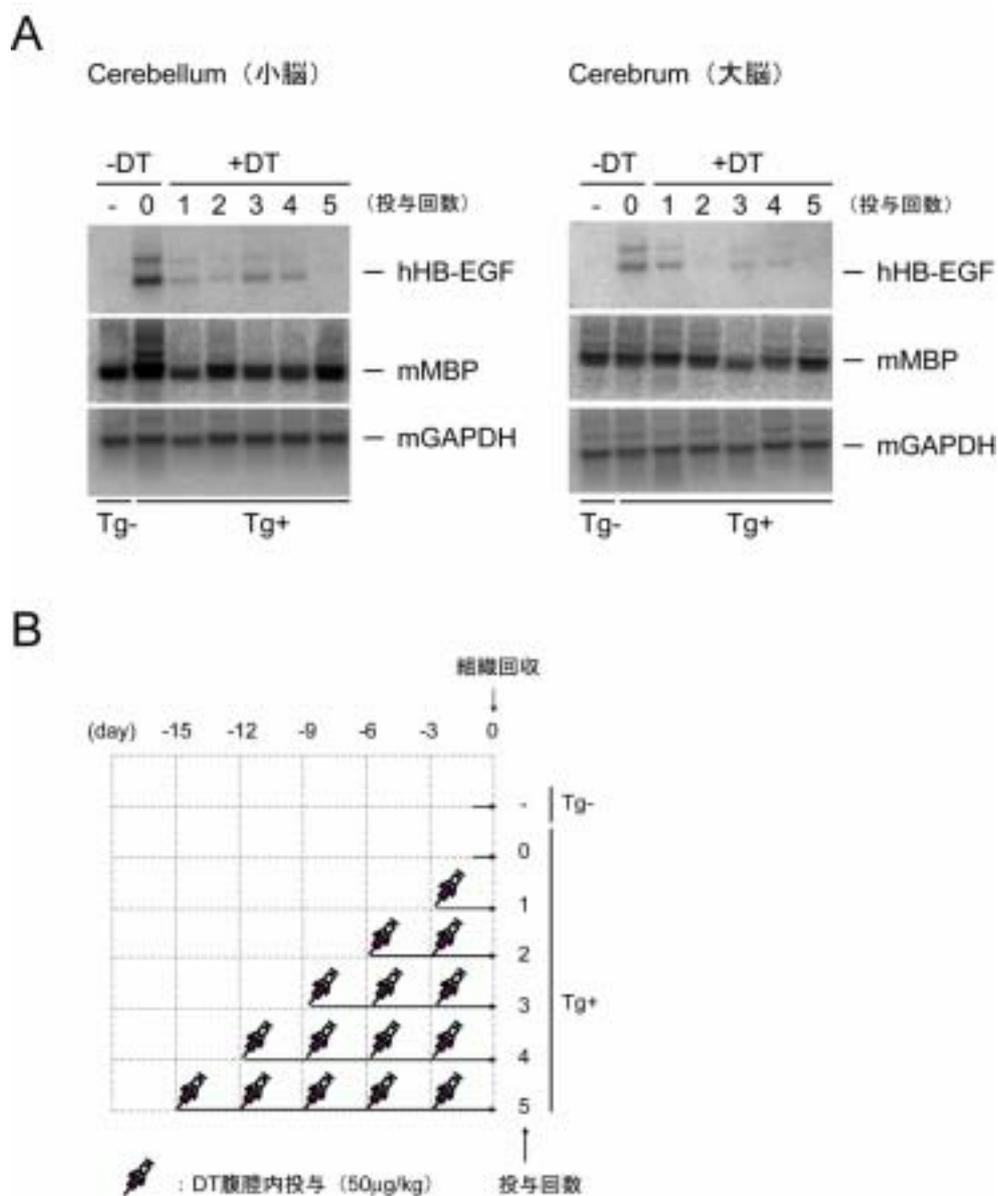


図 2-5 DT 投与後の Northern Blot

A. MBP-1F1 マウスの腹腔内へ DT を投与した時の脳内標的細胞への障害の程度を、Northern Blot により調べた。ここでは DT (50µg/kg) を、(B) のように、3 日おきにそれぞれ、1, 2, 3, 4, 5 回投与したマウスの大脳と小脳から RNA を回収し、各レーンへ 10µg ずつ泳動した。

B. A で行った DT 投与実験の概要図を示した。図では組織を回収した日を 0 として表示した。

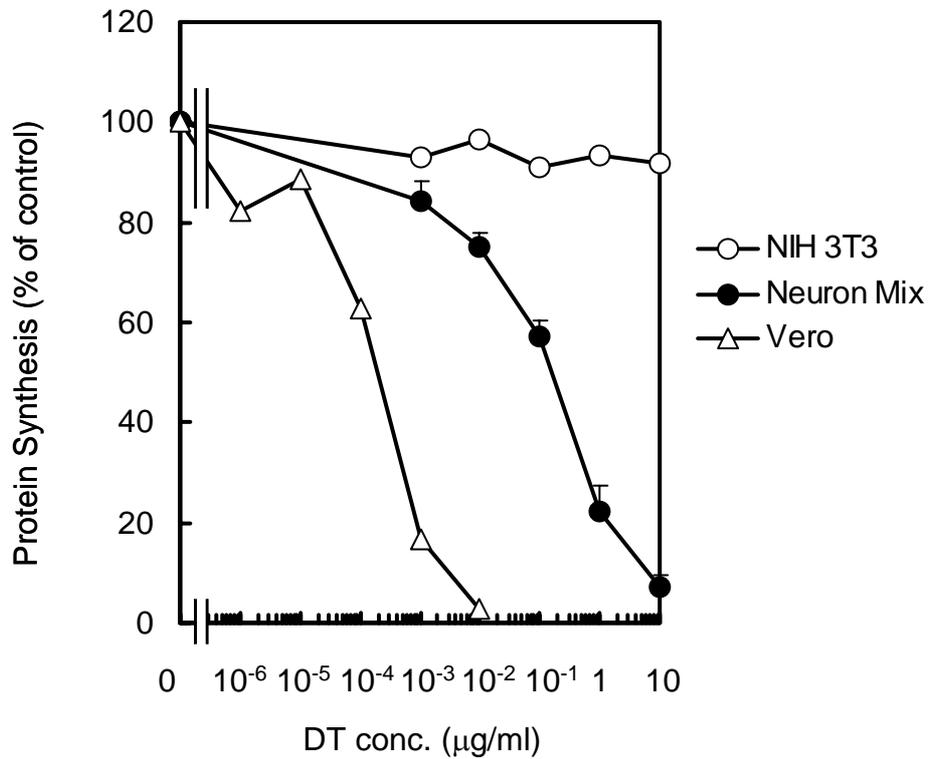


図 2-6 マウス神経細胞の DT 感受性

妊娠 14 日の ICR マウスから胎仔を取り出して、終脳部分を分離した。そして、bFGF を含む N2/DMEM/F12 培地に懸濁させ、オルニチン/ファイブロネクチンコートした 24 ウェルプレートにまき 4 日間培養した (Neuron Mix)。その後、様々な濃度の DT を加えて 6 時間培養し、<sup>35</sup>S ラベル化 Met/Cys を含む培地で 1 時間培養し、タンパク質への放射活性の取り込み量を測定した。ここでは、DT 感受性が高い Vero 細胞で調べた結果も示した。Neuron Mix の値は 3 つの実験の平均で、バーは標準誤差を示し、NIH 3T3 と Vero 細胞の値は 2 つの実験の平均を示す。

## 考察

### MBP-HBEGF トランスジェニックマウスの解析

TRECK法を用いて脳細胞を特異的に除去することが可能であるかどうかを検証するため、MBP プロモーターを用いて、ヒト HB-EGF 遺伝子をオリゴデンドロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。

初めに、Northern Blot により脳組織特異的にヒト HB-EGF の発現が確認された MBP-3M3 マウスの腹腔内へ DT を投与し、脳組織を観察した。その結果、マウスの腹腔内に投与した DT は特別な処置を行わなくても BBB を通過し、ヒト HB-EGF を発現させた脳細胞特異的に障害を与えたと考えられる結果が得られた(図 2-2, 2-3)。しかしこの実験で投与した DT 量(50 $\mu$ g/kg, 4回)は、劇症肝炎様症状を誘発させた時の投与量(5-500ng/kg, 1回)に比べ多く、最適な DT 投与条件は不明であった。ここで標的としたオリゴデンドロサイトは、序論で述べたように、神経細胞の電気信号の伝達に重要な役割を果たしている細胞であり、この細胞への障害がマウスの行動に反映され、DT 投与の影響を評価しやすいことが期待された。しかし、MBP-HBEGF トランスジェニックマウスの腹腔内へ DT 投与を行っても、通常の飼育条件下では、DT 投与の影響を外観で判断することはできず、行動により DT 投与の条件を簡便に決定することはできなかった。そのため次に、MBP-1F1 マウスの腹腔内へ、異なる回数 DT 投与を行い、障害が現れる時期を Northern Blot により検証した。その結果、1回の DT 投与でヒト HB-EGF 発現細胞が減少することを示唆する結果が得られたが、複数回 DT 投与を行っても、内在性 MBP 発現細胞はあまり減少していない可能性が示唆された(図 2-5)。この時、MBP-3M3 マウスでも同様の実験を行ったが、DT 腹腔内投与後のマウス MBP の減少は MBP-1F1 マウスと同様に認められなかった(data not shown)。ただしこの MBP-3M3 マウスは、脳組織でのヒト HB-EGF 発現量が MBP-1F1 マウスに比べ少なく、DT 未投与時においてもヒト HB-EGF の発現がほとんど確認されず、DT 投与後の変化を検証できなかった。このため、ヒト HB-EGF 発現量が少ないラインのマウスを用いて、同様の実験をおこなうためには、少量の RNA の変化を検出可能なリアルタイム PCR による測定を行うことが必要となるかもしれない。

Northern Blot による実験で、ヒト HB-EGF 発現細胞の減少は示唆されたが、MBP 発現細胞の減少が示唆されなかったことより、ヒト HB-EGF と MBP の発現細胞が一致しているかどうかの検討も必要であると考えられた。このため、DT 未投与の MBP-1F1 と MBP-3M3 マウスの脳組織凍結切片で、ヒト HB-EGF 抗体を用いた免疫組織染色を試みた。しかしながらヒト HB-EGF の染色像は得

られなかった (data not shown)。

#### DT 投与後の BBB 透過性の検証

ウエストナイルウイルスの脳内侵入メカニズム (Wang et al., 2004) を手掛かりとして、DT 投与後の BBB 透過性の検証を試みた。そのため、BBB 透過性を高めるポジティブコントロールとして polyIC を用いて実験を行った。Wang らの実験では、50 $\mu$ g/ml の polyIC を野生型マウスの腹腔内へ投与すると、その 24 時間後には脳組織が Evans Blue で染まっており (Wang et al., 2004)、この報告を元にして、50 $\mu$ g/ml の polyIC を 1 匹あたり 1ml ずつマウスの腹腔内へ投与した。しかし、Evance Blue で染まった脳組織は観察されなかった。同時に、DT 投与を行ったマウスの脳組織を観察したが、BBB 透過性が高まるという結果は得られなかった (図 2-4)。引き続き、DT 投与量や回数、観察時期を変更して検証を行うことも考えられたが、Evance Blue を投与したマウスは動きが鈍くなり、また体温の低下も見られたこともあり、Evance Blue を投与し続けた状態で実験を長期間行うことは困難であると判断した。また、Evance Blue を観察直前のみの投与で実験を行うためには、BBB の透過性が高まる時期を正確に予想する必要が生じる。しかし、MBP-HBEGF トランスジェニックマウスを用いた解析結果より、最適な DT 投与条件や観察時期を決めるのにはさらなる検討が必要であった。そもそも、ポジティブコントロールとして用いた polyIC で BBB 透過性が高まるという結果が得られなかったことがあり、図 2-4 以外の条件での DT 投与後の BBB 透過性の検証は行わなかった。また研究開始当初は、polyIC との併用により BBB 透過性を操作して、脳内へ DT を届けることも考えた。しかし、polyIC 投与により BBB 透過性の増加が見られなかったことより、この試みを行うことはできなかった。

#### マウス神経細胞の DT 感受性

マウス初代培養の神経細胞を調整し、培養溶液中へ DT を加えて調べたところ、この神経細胞は DT 感受性を示した。図 2-5 で用いた神経細胞は、マウス胎児の終脳部分から単離した細胞であるが、増殖細胞を殺す薬剤での選択は行っておらず、オリゴデンドロサイトやアストロサイトへと分化する細胞も多く含まれており、細胞中のニューロンの割合は少ない。増殖細胞を殺す作用を持つ AraC を加えて、およそ 8 割程度はニューロンとなる細胞の DT 感受性も調べたが、AraC を加えていない細胞 (図 2-5) と DT 感受性に違いは見られなかった (data not shown) このため、ニューロンだけでなく、オリゴデンドロサイトやアストロサイトも DT 感受性である可能性は高いと考えられ、また、ニューロンとオリゴデンドロサイトやアストロサイトとの DT 感受性に差はないと考えられる。

マウス神経細胞が DT 感受性を示す原因としては、受容体非特異的な DT の取り込みが行われている可能性が考えられる。DT 受容体をもつ培養細胞の DT 感受性を調べる時に得られるタンパク質合成量の低下は、ある濃度を境に急激に低下するが、ここで調整した神経細胞のタンパク質合成量の低下は、培地中の DT 濃度に対してゆるやかな低下が見られることがその根拠として挙げられる。この可能性は、受容体との結合部位に変異が入り、ヒト HB-EGF とは結合できない DT 変異体である CRM45 などを用いることで検証することが考えられる。また、TRECK 法で脳内の細胞を標的として細胞除去を行う際には、神経細胞が DT 感受性を示すことは DT 投与により細胞非特異的な障害をマウスに与えることが懸念される。しかし、ここで見られた神経細胞の DT 感受性は、Vero 細胞よりも 100-1000 倍程度低く、ヒト HB-EGF を発現した神経細胞と内在性の神経細胞との DT 感受性に差があれば、TRECK 法を用いて標的とした神経細胞特異的に障害を与えることは可能であろう。このことは、レトロウイルスベクターを用いてヒト HB-EGF を発現させた神経細胞やトランスジェニックマウスの胎児から単離した神経細胞の DT 感受性を調べることで確認することが考えられる。

#### まとめ

MBP-HBEGF マウスの腹腔内へ DT を投与したところ、マウスの腹腔内に投与した DT は特別な処置を行わなくても BBB を通過し、ヒト HB-EGF を発現させた脳細胞特異的に障害を与えたと考えられる結果が得られた。また、トランスジェーンを発現しただけでは標的細胞へ障害を与えない TRECK 法は、当研究室で行った CID 法との比較により、優れた細胞ノックアウト法であることが再確認されたと言えよう。

一方で、これまでに脳内の細胞を標的とした有効な細胞ノックアウト法は見出されていない。また TRECK 法を用いて脳内の細胞を特異的に除去できる可能性を示唆する報告がなされているが (Buch et al., 2005 ; Gropp et al., 2005 ; Luquet et al., 2005), マウスに投与している DT の量が多いことなど、まだ不明な点がある。そのため、今後、腹腔内への DT 投与量と脳内標的細胞への障害の程度との関連などを検討することにより、TRECK 法を用いた脳細胞除去法を確立することが期待される。それにより、脳内の新たな細胞の生理的機能の解明や、脳細胞に障害をもつ疾患モデル動物を利用した研究が大きく前進すると考えられる。

## 謝辞

HB-EGF に関する研究を行うに当たり大阪大学微生物病研究所の目加田英輔博士，岩本亮博士に多大なご助力をいただきました。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の実験系を構築するに当たり，東京大学医科学研究所，北村俊雄博士に多大なご助力をいただきました。HB-EGF の変異体を作製するに当たり，本学の箱嶋敏雄博士，真板宣夫博士に多大なご助力をいただきました。初代培養の神経細胞を用いた実験を行うに当たり，本学の中島欽一博士，波平昌一博士に多大なご助力をいただきました。トランスジェニックマウスの作製は，本学の斉藤美知子博士および高橋一彰氏に行っていただきました。この場を借りて，感謝いたします。

本研究のテーマを与えてくださり直接ご指導していただいた河野憲二教授，斉藤美知子博士，研究を行うに当たりご指導，ご助力をしていただいた都留秋雄博士，木俣行雄博士，また様々なご助言，ご協力をいただきました河野研のみなさまにお礼を申し上げます。

## 参考資料

### 統計処理の手順

フィッシャーの正確（直接）確率検定を用いた統計学的解析手順の 1 例のみを以下に示す。

表 1-2 より，トランスジーンをインジェクションした受精卵から生まれ，Tail Cut を行ったマウス個体の中で，トランスジーンを導入が確認された個体 (Tg+) の数をまとめ直すと，表 3-1 のようになった。

	Tg+	Tg-	計
TR1	9	94	103
TR5	19	76	95
計	28	170	198

表 3-1 単位 (匹)

この結果から，CAGTR5/GFP (TR5) は，CAGTR1/GFP (TR1) よりも Tg+個体が得られやすいと言えるかどうかを検証するため，「na 匹中 ka 匹が Tg+だった TR1 の集団」と「nb 匹中 kb 匹が Tg+だった TR5 の集団」で，「TR5 の方が Tg+個体が得られる割合が高いか？」と置き換え，有意水準 0.05 で求めた。

そのため，帰無仮説  $H_0$  : 「TR1 と TR5 で，Tg+個体が得られる割合は同じである」を立てた。この帰無仮説は，「TR1 と TR5 は共に同じ母集団からランダムに得られた」とでき，「合計 (na+nb) 匹の中に (ka+kb) 匹の Tg+が混ざっている集団があり，ここからランダムに na 匹採ってきたら，ka 匹の Tg+が混ざっていた」と考えることができる。そこで，帰無仮説  $H_0$  が正しい場合に (na+nb) 匹の中から na 匹採ったら Tg+が ka 匹以下である確率 P を求めれば，「TR5 の方が Tg+個体が得られる割合が高いか？」を検証できる。

マウスの個体数が，表 3-2 のようになる確率 P(a) は，次のような超幾何分布で表される。 $P(a) = (e!f!g!h!) / (n!a!b!c!d!)$  ( )

	Tg+	Tg-	計
TR1	a	b	e
TR5	c	d	f
計	g	h	n

表 3-2

ここでは、 $(na+nb)$  匹の中から  $na$  匹採った時に  $Tg+$  が  $ka$  匹となる確率  $P(ka)$  を Excel (マイクロソフト) の超幾何分布関数 (HYPGEOMDIST) を用いて求め、表 3-3 にまとめた。

表 3-3 より、 $Tg+$  が 9 匹以下である確率  $P$  は、  
 $P = P(0) + P(1) + \dots + P(8) + P(9) = 0.018920845 < 0.05$  となり、  
 TR5 の方が TR1 よりも  $Tg+$  個体が得られる割合が高かった。 ( $P < 0.05$ )

一般的に、「2 つの集団の間に有意差があるか？」を検定する時には両側検定の値が使われることが多いが、上では片側検定の値を求めている。すなわち、「TR1 と TR5 の 2 つの集団に有意差があるか？」を考える時は、「TR5 の方が  $Tg+$  個体が得られる割合が高い」場合だけでなく、「TR1 の方が  $Tg+$  個体が得られる割合が高い」場合も含めて考えることになる。上では、「TR5 の方が  $Tg+$  個体が得られる割合が高い」場合のみを検定しているので片側検定となる。

ここで両側検定を行う、つまり「TR1 と TR5 の 2 つの集団に有意差があるか？」を求めてみる。観測データ (表 3-1) の優位性は、帰無仮説  $H_0$  : 「TR1 と TR5 で、 $Tg+$  個体が得られる割合は同じである」が正しい場合に、同じ観測データもしくはそれよりも極端なデータが得られる総確率で示される。

よって  $(na+nb)$  匹の中から  $na$  匹採った時に  $Tg+$  が  $ka$  匹となる確率  $P(ka)$  に、それよりも極端な場合が得られる確率をすべて加えた確率、つまり  $P(9)$  の値に、 $P(9)$  よりも小さな値を取る  $P(ka)$  の値をすべて加えた確率  $P'$  を求めると、

$$P' = P(0) + P(1) + \dots + P(8) + P(9) + P(21) + P(22) + \dots + P(27) + P(28) \\ = 0.025846344 < 0.05 \quad \text{となり、}$$

TR1 と TR5 の集団で  $Tg+$  個体が得られる割合に有意差があった。 ( $P < 0.05$ )

なおフィッシャーの正確確率検定では多くの統計検定とは異なり、両側検定の値は片側検定の値の 2 倍になるとは限らないので、上のように別々に求める必要がある。

$$P(a) = (e!f!g!h!) / (n!a!b!c!d!)$$

TR1 の集団で、 $e$  匹から  $a$  匹を取り出す方法は、 ${}_eC_a = e! / a!(e-a)! = e! / a!b!$  通りある。同様に、TR5 の集団で、 $f$  匹から  $c$  匹を取り出す方法は、 ${}_fC_c = f! / c!(f-c)! = f! / c!d!$  通りある。TR1 の集団と TR5 の集団は独立事象なので、TR1 の  $e$  匹から  $a$  匹、TR5 の  $f$  匹から  $c$  匹を取り出す方法は、 ${}_eC_a \times {}_fC_c$  通りある。全体の  $n$  匹から、 $g$  匹を取り出す方法は、 ${}_nC_g = n! / g!(n-g)! = n! / g!h!$  通りある。したがって、 $P(a) = ({}_eC_a \times {}_fC_c) / ({}_nC_g) = (e!f!g!h!) / (n!a!b!c!d!)$  となる。

ka	na	ka+kb	na+nb	P(ka)		累積確率 1	累積確率 2
0	103	28	198	1.03735E-10	@	1.03735E-10	1
1	103	28	198	4.3996E-09	@	4.50334E-09	1
2	103	28	198	8.78007E-08	@	9.2304E-08	0.999999995
3	103	28	198	1.09793E-06	@	1.19023E-06	0.999999908
4	103	28	198	9.66485E-06	@	1.08551E-05	0.99999881
5	103	28	198	6.3788E-05	@	7.46431E-05	0.999989145
6	103	28	198	0.000328261	@	0.000402904	0.999925357
7	103	28	198	0.001352333	@	0.001755236	0.999597096
8	103	28	198	0.004543838	@	0.006299074	0.998244764
<b>9</b>	<b>103</b>	<b>28</b>	<b>198</b>	0.01262177	@	0.01892085	0.993700926
10	103	28	198	0.029275953		0.048196798	0.981079155
11	103	28	198	0.057118817		0.105315615	0.951803202
12	103	28	198	0.094233998		0.199549613	0.894684385
13	103	28	198	0.131927597		0.33147721	0.800450387
14	103	28	198	0.157056663		0.488533873	0.66852279
15	103	28	198	0.159099676		0.647633549	0.511466127
16	103	28	198	0.137055745		0.784689294	0.352366451
17	103	28	198	0.100200419		0.884889713	0.215310706
18	103	28	198	0.061953984		0.946843697	0.115110287
19	103	28	198	0.032228205		0.979071902	0.053156303
20	103	28	198	0.014002599		0.993074502	0.020928098
21	103	28	198	0.005031237	@	0.998105739	0.0069255
22	103	28	198	0.001474939	@	0.999580677	0.001894261
23	103	28	198	0.00034629	@	0.999926967	0.000419323
24	103	28	198	6.34231E-05	@	0.99999039	7.30327E-05
25	103	28	198	8.71378E-06	@	0.999999104	9.60968E-06
26	103	28	198	8.43269E-07	@	0.999999947	8.95898E-07
27	103	28	198	5.11676E-08	@	0.999999999	5.26295E-08
28	103	28	198	1.46193E-09	@	1	1.46193E-09

表 3-3

表中の E は 10 のべき乗を示しており，例えば「1.04E-10」は「 $1.04 \times 10^{-10}$ 」のことを示す。有意確率の計算に使った P(ka)値の右側に@印を付け，実験で得られた値（ka=9）を太字で大きく示した。

kb	nb	ka+kb	na+nb	P(kb)		累積確率 1	累積確率 2
0	95	28	198	1.46193E-09	@	1.46193E-09	1
1	95	28	198	5.11676E-08	@	5.26295E-08	0.999999999
2	95	28	198	8.43269E-07	@	8.95898E-07	0.999999947
3	95	28	198	8.71378E-06	@	9.60968E-06	0.999999104
4	95	28	198	6.34231E-05	@	7.30327E-05	0.99999039
5	95	28	198	0.00034629	@	0.000419323	0.999926967
6	95	28	198	0.001474939	@	0.001894261	0.999580677
7	95	28	198	0.005031237	@	0.0069255	0.998105739
8	95	28	198	0.014002599		0.020928098	0.993074502
9	95	28	198	0.032228205		0.053156303	0.979071902
10	95	28	198	0.061953984		0.115110287	0.946843697
11	95	28	198	0.100200419		0.215310706	0.884889713
12	95	28	198	0.137055745		0.352366451	0.784689294
13	95	28	198	0.159099676		0.511466127	0.647633549
14	95	28	198	0.157056663		0.66852279	0.488533873
15	95	28	198	0.131927597		0.800450387	0.33147721
16	95	28	198	0.094233998		0.894684385	0.199549613
17	95	28	198	0.057118817		0.951803202	0.105315615
18	95	28	198	0.029275953		0.981079155	0.048196798
<b>19</b>	<b>95</b>	<b>28</b>	<b>198</b>	0.01262177	@	0.993700926	0.01892085
20	95	28	198	0.004543838	@	0.998244764	0.006299074
21	95	28	198	0.001352333	@	0.999597096	0.001755236
22	95	28	198	0.000328261	@	0.999925357	0.000402904
23	95	28	198	6.3788E-05	@	0.999989145	7.46431E-05
24	95	28	198	9.66485E-06	@	0.99999881	1.08551E-05
25	95	28	198	1.09793E-06	@	0.999999908	1.19023E-06
26	95	28	198	8.78007E-08	@	0.999999995	9.2304E-08
27	95	28	198	4.3996E-09	@	1	4.50334E-09
28	95	28	198	1.03735E-10	@	1	1.03735E-10

表 3-4

(na+nb) 匹の中から nb 匹採ったら Tg+が kb 匹以上である確率を求めて計算しても結果は変わらないことを示す。表中の記号などは，表 3-3 と同じ。

## 参考文献

Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., *et al.* (2002). Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* 8, 35-40.

Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871-927.

Borrelli, E., Heyman, R., Hsi, M., and Evans, R. M. (1988). Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7572-7576.

Breitman, M. L., Clapoff, S., Rossant, J., Tsui, L. C., Glode, L. M., Maxwell, I. H., and Bernstein, A. (1987). Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science* 238, 1563-1565.

Brockschneider, D., Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Boesl, M. R., Nave, K. A., and Riethmacher, D. (2004). Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. *Mol Cell Biol* 24, 7636-7642.

Buch, T., Heppner, F. L., Tertilt, C., Heinen, T. J., Kremer, M., Wunderlich, F. T., Jung, S., and Waisman, A. (2005). A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2, 419-426.

Campion, S. R., and Niyogi, S. K. (1994). Interaction of epidermal growth factor with its receptor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 49, 353-383.

Cha, J. H., Brooke, J. S., Chang, M. Y., and Eidels, L. (2002). Receptor-based antidote for diphtheria. *Infect Immun* 70, 2344-2350.

Cha, J. H., Chang, M. Y., Richardson, J. A., and Eidels, L. (2003). Transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor are sensitive to the toxin. *Mol Microbiol* 49, 235-240.

Goishi, K., Higashiyama, S., Klagsbrun, M., Nakano, N., Umata, T., Ishikawa, M., Mekada, E., and Taniguchi, N. (1995). Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. *Mol Biol Cell* 6, 967-980.

Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A. W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., *et al.* (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci* 8, 1289-1291.

Heckel, J. L., Sandgren, E. P., Degen, J. L., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1990). Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* 62, 447-456.

Heyman, R. A., Borrelli, E., Lesley, J., Anderson, D., Richman, D. D., Baird, S. M., Hyman, R., and Evans, R. M. (1989). Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2698-2702.

Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddes, J. C., and Klagsbrun, M. (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251, 936-939.

Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (1995). The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J Cell Biol* 128, 929-938.

Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G. E., Abraham, J. A., and Klagsbrun, M. (1992). Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J Biol Chem* 267, 6205-6212.

Hirata, M., Umata, T., Takahashi, T., Ohnuma, M., Miura, Y., Iwamoto, R., and Mekada, E. (2001). Identification of serum factor inducing ectodomain shedding of proHB-EGF and studies of noncleavable mutants of proHB-EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 915-922.

Honjo, T., Nishizuka, Y., and Hayaishi, O. (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem* 243, 3553-3555.

Ihle, J. N., Keller, J., Henderson, L., Klein, F., and Palaszynski, E. (1982). Procedures for the purification of interleukin 3 to homogeneity. *J Immunol* 129, 2431-2436.

Ishii-Kanei, C., Uchida, T., and Yoneda, M. (1979). Isolation of a cured strain from *Corynebacterium diphtheriae* PW8. *Infect Immun* 25, 1081-1083.

Ito, N., Kawata, S., Tamura, S., Kiso, S., Tsushima, H., Damm, D., Abraham, J. A., Higashiyama, S., Taniguchi, N., and Matsuzawa, Y. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor is a potent mitogen for rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 25-31.

Iwamoto, R., Handa, K., and Mekada, E. (1999). Contact-dependent growth inhibition and apoptosis of epidermal growth factor (EGF) receptor-expressing cells by the membrane-anchored form of heparin-binding EGF-like growth factor. *J Biol Chem* 274, 25906-25912.

Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J* 13, 2322-2330.

Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., *et al.* (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3221-3226.

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., and Mekada, E. (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J* 17, 7260-7272.

Jackson, L. F., Qiu, T. H., Sunnarborg, S. W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C., and Lee, D. C. (2003). Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J* 22, 2704-2716.

Jalabi, W., Boehm, N., Grucker, D., and Ghandour, M. S. (2005). Recovery of myelin after induction of oligodendrocyte cell death in postnatal brain. *J Neurosci* 25, 2885-2894.

Kaneko, S., Hikida, T., Watanabe, D., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kreitman, R. J., Pastan, I., and Nakanishi, S. (2000). Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* 289, 633-637.

Kawasaki, T., Tamura, S., Kiso, S., Doi, Y., Yoshida, Y., Kamada, Y., Saeki, A., Saji, Y., and Matsuzawa, Y. (2005). Effects of growth factors on the growth and differentiation of mouse fetal liver epithelial cells in primary cultures. *J Gastroenterol Hepatol* 20, 857-864.

Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Higashiyama, S., Ito, N., Tsushima, H., Taniguchi, N., and Matsuzawa, Y. (1995). Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 22, 1584-1590.

Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Inui, Y., Yoshida, Y., Sawai, Y., Umeki, S., Ito, N., Yamada, A., Miyagawa, J., *et al.* (2003). Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology* 124, 701-707.

Kobayashi, K., Morita, S., Sawada, H., Mizuguchi, T., Yamada, K., Nagatsu, I., Fujita, K., Kreitman, R. J., Pastan, I., and Nagatsu, T. (1995). Immunotoxin-mediated conditional disruption of specific neurons in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1132-1136.

Kohno, K., Uchida, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Nakanishi, T., Fukui, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M., and Okada, Y. (1986). Amino acid sequence of mammalian elongation factor 2 deduced from the cDNA sequence: homology with GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4978-4982.

- Louie, G. V., Yang, W., Bowman, M. E., and Choe, S. (1997). Crystal structure of the complex of diphtheria toxin with an extracellular fragment of its receptor. *Mol Cell* *1*, 67-78.
- Lowell, B. B., V, S. S., Hamann, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J., Boyer, B. B., Kozak, L. P., and Flier, J. S. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* *366*, 740-742.
- Luquet, S., Perez, F. A., Hnasko, T. S., and Palmiter, R. D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* *310*, 683-685.
- Mallet, V. O., Mitchell, C., Guidotti, J. E., Jaffray, P., Fabre, M., Spencer, D., Arnoult, D., Kahn, A., and Gilgenkrantz, H. (2002). Conditional cell ablation by tight control of caspase-3 dimerization in transgenic mice. *Nat Biotechnol* *20*, 1234-1239.
- Mathis, C., Hindelang, C., LeMeur, M., and Borrelli, E. (2000). A transgenic mouse model for inducible and reversible dysmyelination. *J Neurosci* *20*, 7698-7705.
- Means, A. L., Ray, K. C., Singh, A. B., Washington, M. K., Whitehead, R. H., Harris, R. C., Jr., Wright, C. V., Coffey, R. J., Jr., and Leach, S. D. (2003). Overexpression of heparin-binding EGF-like growth factor in mouse pancreas results in fibrosis and epithelial metaplasia. *Gastroenterology* *124*, 1020-1036.
- Mekada, E., Okada, Y., and Uchida, T. (1988). Identification of diphtheria toxin receptor and a nonproteinous diphtheria toxin-binding molecule in Vero cell membrane. *J Cell Biol* *107*, 511-519.
- Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (1995). Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem* *270*, 1015-1019.
- Mitamura, T., Umata, T., Nakano, F., Shishido, Y., Toyoda, T., Itai, A., Kimura, H., and Mekada, E. (1997). Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin

binding site by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 272, 27084-27090.

Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L. F., Fox, R., Lee, D. C., Campbell, J. S., and Fausto, N. (2005). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 280, 2562-2568.

Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063-1066.

Moskaug, J. O., Stenmark, H., and Olsnes, S. (1991). Insertion of diphtheria toxin B-fragment into the plasma membrane at low pH. Characterization and topology of inserted regions. *J Biol Chem* 266, 2652-2659.

Naglich, J. G., Metherall, J. E., Russell, D. W., and Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051-1061.

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161, 653-660.

Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.

Nosaka, T., Kawashima, T., Misawa, K., Ikuta, K., Mui, A. L., and Kitamura, T. (1999). STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J* 18, 4754-4765.

Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-787.

Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H., and Brinster, R. L. (1987). Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific

expression of a toxin gene. *Cell* 50, 435-443.

Pappenheimer, A. M., Jr. (1977). Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 46, 69-94.

Pappenheimer, A. M., Jr., Harper, A. A., Moynihan, M., and Brockes, J. P. (1982). Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J Infect Dis* 145, 94-102.

Pardridge, W. M. (2002). Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron* 36, 555-558.

Provenzano, A. P., Besner, G. E., James, P. F., and Harding, P. A. (2005). Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) overexpression in transgenic mice downregulates insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and -4 mRNA. *Growth Factors* 23, 19-31.

Ross, S. R., Graves, R. A., and Spiegelman, B. M. (1993). Targeted expression of a toxin gene to adipose tissue: transgenic mice resistant to obesity. *Genes Dev* 7, 1318-1324.

Rubin, L. L., and Staddon, J. M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22, 11-28.

Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 19, 746-750.

Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10, 1366-1373.

Watanabe, D., Inokawa, H., Hashimoto, K., Suzuki, N., Kano, M., Shigemoto, R., Hirano, T., Toyama, K., Kaneko, S., Yokoi, M., *et al.* (1998). Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination. *Cell* 95, 17-27.

Wrobel, C. J., Wright, D. C., Dedrick, R. L., and Youle, R. J. (1990). Diphtheria toxin effects on brain-tumor xenografts. Implications for protein-based brain-tumor chemotherapy. *J Neurosurg* 72, 946-950.

Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., and Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15, 245-250.

Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., *et al.* (2003). Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol* 163, 469-475.

岩脇隆夫 (1997) 動物個体内での組織特異的細胞ノックアウト法の開発 奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 9571016)

河原真弓 (2005) 脳細胞特異的破壊を目的とした CID 法の利用 奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 0371027)

斉藤美知子 (2005) 毒素受容体を利用した細胞ノックアウト法 TRECK の開発と応用 奈良先端科学技術大学院大学博士論文

古川智久 (2003) 改良型ジフテリア毒素受容体の作成と解析 奈良先端科学技術大学院大学修士論文 (修士論文番号 0171095)