

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22592333

研究課題名（和文） 粘液関連遺伝子制御による感染予防法の開発

研究課題名（英文） Development of infection prophylaxis by mucus-related gene control

研究代表者

鶴田 圭伊子 (Tsuruda Keiko)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：10112210

研究成果の概要（和文）：消化管粘膜に発現する粘液産生に関係する遺伝子 MUC1 の感染抵抗性に着目し、細菌感染防御能との関係性を明らかにすることを目的として、MUC1 遺伝子導入細胞の作製を実施し、培養細胞を用いた細菌感染実験系の確立を行い、MUC1 遺伝子による感染防御能について検討した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focus on the MUC1 gene involved in mucus which has the ability of infection resistance. The aim of this study is to clarify the relationship between MUC1 and the ability of defending against infection. MUC1 gene was transfected to mammalian cells, and we examined the ability to defend against bacterial infection in the cells with MUC1 expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：予防歯科学

1. 研究開始当初の背景

歯科疾患に対する予防方法については、様々な取り組みや研究がなされている。う蝕予防ではフッ素応用やブラッシングによるプラークコントロールが功を奏し、う蝕の減少傾向が続いているのに対し、歯周疾患に対しては有効な予防方法が未だ十分に確立されておらず、十分な予防効果を上げていない。本来自ら持っている機能をアップすることにより、疾患予防を目指そうとすることは、健康の増進という理念に適うものであり、特

に、複雑なメカニズムで発症進展する歯周疾患には、より効果的な予防法となり得ると考えられる。

口腔、鼻腔に始まる粘膜系は、細菌侵入などの外来性病原因子の侵襲に対する第一線の防御バリアーとして重要な役割を果たしている。粘膜系に共通する特徴として、粘液が防御機能において重要な役割を担っていることがよく知られている。これらを産生する粘液産生細胞は、粘膜へのストレス刺激などにより種々の粘液遺伝子を発現している。

近年、消化管粘膜において膜結合型ムチンコア蛋白遺伝子 MUC1 が *Campyrobacter jejuni* の消化管感染およびその産生毒素である CDT (cytiletal distending toxin) に対して抵抗性を示すということが初めて報告された。この CDT は歯周病原性細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) においても発現していることが Sugai らによって明らかにされている。さらに我々は Aa の CDT が上皮細胞を始めとする種々の細胞に対して細胞障害性を示すことを見出ししている。これらのことは、歯周病原性細菌の病原性に対する口腔粘膜の直接的な抵抗性、新たな口腔粘膜強化法の可能性を示唆するものである。しかしながら、粘膜系の一つである口腔粘膜局所における MUC1 などの粘膜遺伝子と歯周病原性細菌の病原性を追求した研究は見当たらない。

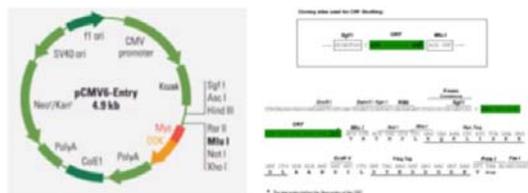
2. 研究の目的

消化管粘膜に発現し粘液産生に関係する遺伝子 MUC1 の感染防御能に着目して口腔粘膜への細菌感染防御能との関係性を明らかにし、口腔粘膜感染の予防法への応用を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MUC1 遺伝子

細胞表面結合型 Mucin 1 遺伝子を用いた。ヒト MUC1 の ORF clone を導入用に準備した (図 1)。



```
>RC221340 representing NM_002456
Red=Cloning site Blue=ORF Green=Tags (s)
GACGTTGTATACGACTCTCTATAGGGCGGCGGGAATTCGTGACTGGATCCGGTACCGAGGAGATCTGCC
GCCGCGATCGCC
ATGACACCGGGCACCCAGCTCTCTTTCTCTCTGCTGCTCTCTCACAGTGTTCACAGTTGTACAGGTT
CTGGTCAATGCAAGCTTACCCCGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAGTTTCAGTCCCGCAG
CTCTACTGAGAAGAAATGTTTGTCTACTGGGCTCTCTTTCTTTCTCTCTTTTTCACATTTCAAACAGC
CAGTTTAACTCTCTCTGGAGATCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAA
TGTTTTGACAGTTTATAAACAGGGGGTTTTCTGGGCTCTCCAATATTAAGTTACGGCCAGGATCTGAAA
GGTGGTACAATTGACTCTGGCCTCCGAGAAGGTACCAATCAATGTCCACAGCTGGAGACAGTCAAT
CAGTATAAACGGAAGCAGCTCTCGATATAAAGCTGACGATCTCAGACGTCAGCGTGAAGTGTGCAAT
TTCCTTCTCTGCCAGTCTGGGCTGGGGTGCAGGCTGGGGCATCGGCTGCTGGTCTGTGTGTGT
TCTGGTTGGCTGGCCATTTCTATCTCAATTTGCTTGGCTGTCTGTCAAGTGGCCGCGAAGAACTAGCGG
CAGCTGGACATCTTCCAGCCGGGATACCTACCATCTATGAGCCAGTACCCACCTACCCACCCCAITG
GGCGCTATGGCCCCAGCAGTACCGATCTTACGCCCTTATGAGAGGTTTCTCGAGGTAATGGTGGCAG
CAGCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAAGCTG
ACGCGTACGCGCGCCTCGAGCAGAACTCATCTCAGAAGGATCTGGCAGCAATGATATCTCGTAA
ACAAGGATGACGAGATAAGGTTTAA
```

図1 MUC1遺伝子ORFとクローニングベクターおよびMUC1遺伝子配列

(2) MUC1 遺伝子導入

C 末端に MYC/DDK タグを有する哺乳動物用の発現ベクター-pCMV6 に MUC1 clone を挿入した pCMV6-MUC1 と空ベクターで

ある pCMV6 Entry を準備した。上皮細胞の HeLa 細胞とリンパ球系細胞の RAW 細胞を導入用に準備した。遺伝子導入剤であるカチオン性脂質 Lipofectamine2000 (Invitrogen) を使用したリポフェクション法により、pCMV6-MUC1 と pCMV6 Entry を HeLa 細胞と RAW 細胞に遺伝子導入を行った。トランジェントトランスフェクションならびに安定発現株の樹立を行った。すなわち、選択マーカーとして G418 (ジェネティシン) を 500~1000 μ g/ml 濃度で細胞に応じて使用した。選択マーカーで生き残った細胞を 2~3 週間後に確認し、クローニング操作を行った。ペニシリンキャップ法を用い、トリプシン処理にて単離した。

(3) MUC1 遺伝子発現の検出

発現ベクターの有する MYC/DDK タグに対する特異的抗体を用い、SDS-PAGE と Western blot 法により、MUC1 タンパク質の発現の確認を行った。

(4) CDT の調整

pQE60Aa-cdtABC を導入した *E. coli* M15 形質転換株を作製し、IPTG 誘導による CDT タンパクの発現後、Ni-NTA 精製を行い、リコンビナント Aa-CDT を調整した。

(5) MUC1 導入細胞への CDT 感染実験

6 ウェルプレートでコンフルエントに培養した MUC1 導入 HeLa 細胞に、リコンビナント AaCDT を最終濃度 100 ng/ml になるように添加し、24 時間 CO₂ インキュベータにて反応を行い、トリプシン処理にて HeLa 細胞を回収した。細胞障害性は、ヨウ化プロピジウム (PI) による核染色を用いた DNA 細胞周期解析によって測定した。さらに、CDT 発現菌体の感染実験の検討も行った。

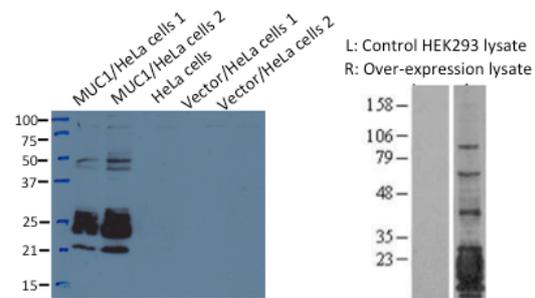


図2 DDK 特異抗体を用いたウェスタン検出

4. 研究成果

(1) MUC1 遺伝子導入

MUC1 安定発現株の確立を目指して、エレクトロポレーション法およびリポフェクション法を行ったが、HeLa 細胞ならびに RAW 細胞において MUC1 安定株を得ることができなかった。遺伝子導入効率としては、リポフェクション法の方がよかったので、2 種類の脂質系遺伝子導入剤を用いて安定株のク

ローニングを行った。その結果、Lipofectamine2000により空ベクターであるpCMV6 Entryの安定発現株を作製することができた。しかし、MUC1安定株の作製には至らなかった。標準細胞には癌化した細胞が多く、HeLa細胞やRAW細胞も癌化細胞であり、MUC1遺伝子は癌化した細胞で発現上昇が見られるという報告があるため、遺伝子の導入が困難であった可能性がある。MUC1発現がほとんど認められない癌化標準細胞株を用いて検討することが必要であると考えられた。トランジェントトランスフェクションでは良好な結果が得られ、タグDDKに対する特異抗体により、MUC1遺伝子導入細胞においてのみMUC1タンパク質の発現を確認した(図2)。

(2) MUC1過剰発現細胞における感染防御

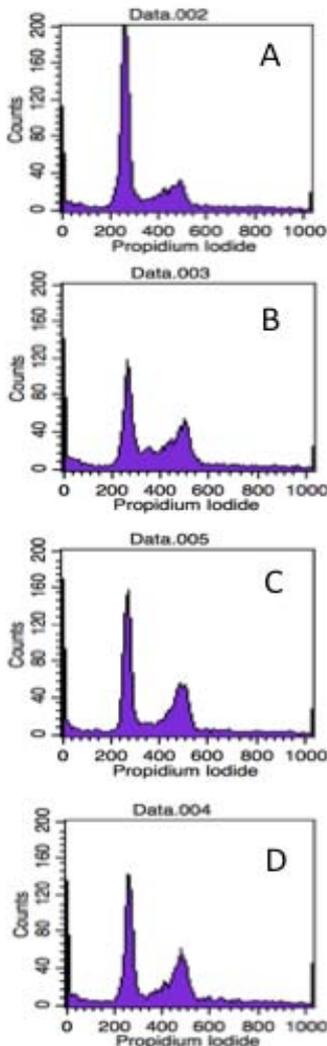


図3 MUC1発現細胞へのCDT作用による細胞周期の変化

A: HeLa細胞(CDT作用なし), B: HeLa細胞(CDT作用), C: Vector導入HeLa細胞(CDT作用), D: MUC1導入HeLa細胞(CDT作用)

MUC1遺伝子をトランジェントに導入したHeLa細胞を用いて、Aa菌のCDTを作用させて細胞障害性を調べた結果を図3に示した。CDTは標的細胞にDNA二重鎖切断を起こし、最終的にアポトーシスを誘導して標的細胞を死に至らせることが知られている。この過程において細胞周期のG2/M期停止が誘導される。CDTを作用させたHeLa細胞(B)ではG1期の細胞(左ピーク)がコントロール(A)に比べて少なくなっているのに対し、G2期の細胞(右ピーク)が増加しており、G2アレストが起こっていることが示された。それに対して、MUC1発現HeLa細胞にCDTを作用させると、G1期細胞は多く、G2期細胞が少ないことが示された。G1期、G2期の細胞比率を表3に示した。G2期の細胞比率は、CDTを作用したHeLa細胞が42.6%であったのに対してMUC1発現HeLa細胞は38.7%と低い値であった。このことはMUC1によってCDTによる細胞障害性が現弱されたことを表している。しかし、遺伝子のトランジェント導入では、どの程度の細胞にMUC1が導入されているか明らかではないので、正確な感染防御能を数値化することが困難であった。そのためにもMUC1安定発現株のクローニングが重要と考えられる。MUC1安定発現株におけるCDTに対する抵抗性の追求が必要である。

表1 FACS解析ヒストグラムにおけるG1期、G2期の細胞比率(%)

	G1 phase	G2 phase
HeLa cells (control)	62.61 ± 2.07	26.54 ± 2.02
HeLa cells (CDT作用)	43.95 ± 0.56	42.62 ± 1.23
Vector expressed HeLa cells (CDT作用)	46.45 ± 0.55	39.86 ± 0.53
MUC1 expressed HeLa cells (CDT作用)	45.56 ± 0.95	38.68 ± 0.20

以上のように本研究を通じて、MUC1遺伝子による歯周病原性細菌の有する細胞障害性因子に対する防御能を明らかにすることができた。しかしながら、MUC1安定発現株の確立やそれを用いた感染防御能の検討等、今後の課題も明らかとなった。さらに、Aa菌を用いた感染に対するMUC1遺伝子の働きについても検討することにより、歯周病原性細菌に対する予防法の足がかりとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴田 圭伊子 (Tsuruda Keiko)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：10112210

(2) 研究分担者

菅井 基行 (Sugai Motoyuki)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：10201568

(3) 連携研究者

()

研究者番号：