

＜研究課題＞ 各種転写因子群のタンパク質導入による、高齢者軟骨組織再生法の開発

代表研究者 東北大学病院・顎口腔機能治療部

助教 菅崎弘幸

【まとめ】

高齢化が進行中の日本において関節症患者数が増加しつつあり、軟骨採取の外科的侵襲や軟骨細胞の体外培養を行わない、新しい軟骨組織再生法の確立が望まれている。本研究課題では細胞膜通過配列を付加した転写因子を外来性に導入することで細胞の動態・運命が制御可能であった結果を得た。このことは、細胞膜通過配列を付加した転写因子を用いることで、将来的には軟骨組織再生法へ応用できることが示唆された。

1. 研究の目的

高齢化が進行中の日本において加齢に伴い発症する関節症患者数が増加しつつある(1)。治療法として過去の対症療法から近年は自家軟骨細胞を体外培養後に移植する細胞療法へ移行しつつある。しかしこの細胞療法は、患部以外からの軟骨組織採取という外科的侵襲があることや、培養中に震災が発生した場合の停電によるインキュベーター機能不全や、液体窒素タンク倒壊による凍結細胞の損害などの地震多発国日

本においては潜在的なリスクを有するなど問題が多い。

近年 iPS 細胞誘導などに転写因子のタンパク質導入法応用が報告されている(2)。タンパク質導入法とは、標的細胞に導入したい転写因子などに細胞膜通過配列を付加し細胞膜通過能を与え、標的細胞の分化や機能を人為的に制御する方法である(3)。本研究課題では、患部周囲細胞へはじめに細胞増殖活性増強因子として Elk1 (4) を導入し患部周囲の細胞を増加させ、次に軟骨細胞分化促進因子である SOX9 (5) を導入し軟骨細胞分化を促進することで、軟骨採取の外科的侵襲や軟骨細胞の体外培養を行わない、新しい軟骨組織再生法の開発を目指し、研究を行った。

2. 研究方法と経過

2-1 細胞

マウス骨芽細胞セルライン MC3T3E1 は理研セルバンクから購入して用いた。

2-2 ヒト Elk1, SOX9 変異体作製

ヒト骨肉腫細胞セルライン MG63 cDNA から、ヒト Elk1 の CDS 領域の 5' 3' 側にそれぞれプライマーを設定し

全 CDS 領域を含む PCR コンストラクトを作製した。このときにそれぞれのプライマーに制限酵素配列単独あるいは制限酵素配列ならびに NLS 配列 (D PKKKRKV x 3) を付加し PCR プロダクトへ NLS 配列を付加した。

ヒト SOX9 CDS クローンについては、市販されている MGC プライマーヒト CDNA クローン (TOT TCH10 03) を用いて全長 CDS を入手し、上述のような制限酵素 site、NLS 配列を組み込んだ degenerated PCR primer を用いて PCR を行い、得られた PCR プロダクトをアガロースゲル電気泳動、精製した。

つぎに制限酵素で PCR プロダクト切断後に大腸菌発現プラスミド pASK-I BA44 (IBA GmbH) へライゲーションした。さらに構築したコンストラクトへ 11R 配列を付加すべく、site directed mutation を行った。すなわち、CDS 領域直前あるいは直後とプラスミドバックボーン領域に 24 塩基相同性を持たせた上でアルギニンコドン (5'プライマー) あるいは 6 (3'プライマー) 付加したプライマーならびに high fidelity PCR 酵素である Prime Star Max (タカラバイオ) を用いて PCR を行い、その後変異が導入されていないテンプレートプラスミド DNA を分解する目的でメチル化されている GATC 配列を認識切断する DpnI (New England Biolabs) 処理を行った後、コンピテントセルへ形質転換した。

形質転換したコンピテントセルからプラスミドを抽出し配列を確認後にそ

のプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) (バイオダイナミクス研究所) へ形質転換した。

2-3 変異体タンパク質の精製

形質転換した大腸菌 BL21(DE3) を前培養し OD 値が 0.5 となった時点でテトラサイクリンを最終濃度 0.2mg/L となるように添加し、各変異体タンパク質の発現誘導を行った。その後発現されたタンパク質を periplasm から Strep-Tactin Spin Column purification kit (IBA GmbH) を用いて精製した。

2-4 精製タンパク質溶液中のエンドトキシン定量・除去

精製タンパク質溶液中のエンドトキシン量をリムルスカラー KY テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。その後、エンドトキシン混入量が高い精製タンパク質についてエンドトキシン除去を、Endotoxin removal kit (ジェンスクリプト) を用いて行った。エンドトキシン除去後、エンドトキシン混入量を再測定し 0.1 EU/ml 以下となるまでエンドトキシン除去を繰り返した。

2-5 精製タンパク質の確認

精製タンパク質を変性条件下でミニプロティアン TGX ゲル (BioRad) を用いて電気泳動を行った。泳動後、Bio-Safe クマシーステイン (BioRad) で各タンパク質バンドを可視化した。

また、western blot analysis にて各タンパク質バンドの同定を行うべく、同様に泳動したゲルを iBlot blotting system を用いて PVDF メンブレンへ転写し、ブロッキング、1次抗体反応 (ラビット IgG 抗 ELK1 抗体 (アブカム))、

2次抗体反応(HRP標識抗rabbit IgG)後に、ECL基質としてLuminata Forte (ミリポア)を用いてバンドの検出をLAS4000mini (フジフィルム)で行った。

2-6 細胞増殖アッセイ

マウス骨芽細胞セルライン MC3T3E1を 2×10^4 cells/cm²で24 well plateへ播種し、PBSまたはPBS中にストックしているリコンビナントElk1変異体を終濃度0.6 μ g/mlとなるように添加し培養を行った。24時間後にCell Proliferation Reagent WST-1 (ロシュ)を添加し、さらに2時間培養後に培養液を回収し、吸光プレートリーダーにて600nmリファレンス波長として450nmの吸光度を測定しElk1変異体添加の細胞増殖への影響を測定した。

2-7 統計処理

サンプル間の有意差検定は、Tukeyの多重検定法 (<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/testdocs/tomocom/tukey.html>)にて行った。p < 0.05を有意差ありと判定した。

3. 研究の成果

3-1 リコンビナントElk1変異体構築

各ステップでシークエンス確認を行った後に次ステップへ進み、最終的に大腸菌BL21でヒトElk1変異体を発現させ、その精製を行った。精製したヒトElk1変異体(Elk1-NLSx3-11R)をSDS-PAGEゲル中の電気泳動後にCoomassie Brilliant Blue染色を行い、そのバンドサイズを確認したところ、40~5

0kDaであった。ヒトElk1は428アミノ酸残基でその分子量は計算上44.9kDaとなり、x3 NLS配列(3.0kDa)や11R(1.7kDa)を加味してもバンドサイズは適正なものと思われた。

次にwestern blot analysisにてこのサイズのタンパク質バンドが抗Elk1抗体を用いて検出を行えるかどうかを検索した。Figure 3に示したとおり、このバンドは抗Elk1抗体に反応していることからヒトElk1リコンビナント変異体タンパク質が作製されたものと考えられた。

3-2 ヒトリコンビナントElk1変異体の細胞増殖促進効果

次に構築されたヒトElk1リコンビナント変異体が細胞増殖促進効果を有しているかどうかをC末への付加領域有無変異体間で比較検討した。マウス骨芽細胞セルラインMC3T3E1に核膜通過ドメイン(NLSx3)と細胞膜通過ドメイン(11R)を有するヒトElk1リコンビナント変異体(Elk1-NLSx3-11R)を添加するとコントロールに比較して細胞増殖の著しい促進が観察された。細胞膜通過ドメインを有したElk1-11Rではわずかな増殖促進傾向が見られたが、細胞膜通過ドメイン・核膜通過ドメインを付加していないインタクトElk1では細胞増殖促進効果は示さなかった。これらのことから、細胞膜通過ドメインを付加したヒトElk1リコンビナント変異体は細胞外から細胞内へ移行し、さらに核内まで移行することで転写因子としての機能を発揮し、細胞増殖促進効果を示したことが示唆され

た。

これらの結果から細胞膜・核膜通過能を有するヒトリコンビナントElk1変異体を構築し、それを細胞外から適用することで標的細胞の増殖促進が行えることが明らかとなった。このことから本タンパク質導入法を適用することで組織再生希望部位での細胞増殖促進が行える可能性があることが示唆された。

3-3 ヒトリコンビナントSOX9変異体

現在全長CDS単独ならびに全長CD S 末端に制限酵素サイトならびにNLSシグナルを付加したフラグメントをクローニングベクターにのせ、site specific mutation を行うことで11R変異を付加する部分を実行中である。

4. 今後の課題

構築したヒトElk1変異体の細胞内局在はまだ確認しておらず、核移行シグナル付加により核への局在が促進されているかどうかを確認する必要がある。

現在SOX9変異体を構築中であり、それらが構築され次第、細胞培養実験系にて標的細胞を軟骨細胞系への分化が促進できるかどうかを確認する予定である。培養実験系で各変異体の機能を検証後、動物実験にて軟骨組織再生がin situで行えるかどうかを検証する。

5. 研究成果の公表方法

しかるべきデータが出た時点で学術論文としてまとめ、論文投稿を行う。投稿先としてBone, Journal of bone and mineral researchなどを検討している。

参考文献

- 1) 「今後の調査研究の在り方について」平成19年8月 介護予防の推進に向けた運動器疾患対策に関する検討会
- 2) Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Scholer, H. R., Duan, L., and Ding, S. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell* 4, 381-384
- 3) Caron, N. J., Torrente, Y., Camirand, G., Bujold, M., Chapdelaine, P., Leriche, K., Bresolin, N., and Tremblay, J. P. (2001) Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 3, 310-318
- 4) Hodge, C., Liao, J., Stofega, M., Guan, K., Carter-Su, C., and Schwartz, J. (1998) Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *The Journal of biological chemistry* 273, 31327-31336
- 5) Akiyama H. (2008) Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol.* 18(3), 213-219.