[原著論文]

機能喪失ヒト乳清酸性タンパク質 (WAP) 遺伝子の復元とその機能解析

松羅里奈^{1*}、関 真美²、岩森督子³、生見尚子⁴、加納 聖¹、
内藤邦彦¹、東條英昭⁵

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科応用遺伝学教室 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

² 興和(株) 東京創薬研究所 〒189-0022 東京都東村山市野口町 2-17-43

³ Department of Pathology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, S217, Houston, TX 77030, USA

⁴ (独立行政法人) 医薬品医療機器総合機構 〒100-0013 東京都千代田区霞が関 3-3-2、新霞が関ビル

⁵ ヤマザキ動物看護短期大学 〒192-0364 東京都八王子市南大沢 4-7-2

* 現所属：大正製薬(株) 医薬開発部 〒170-8633 東京都豊島区高田 3-24-1

Restoration of nonfunctional human whey acidic protein (WAP) gene and analysis of its function

Rina Matsura^{1*}, Mami SEKI², Tokuko IWAMORI³, Naoko NUKUMI⁴,
Kiyoshi KANO¹, Kunihiro NAITO¹, Hideaki TOJO⁵

¹ Laboratory of Applied Genetics, The University of Tokyo, Bunkyo-ku 113-8657, Tokyo.

² Kowa Co., Ltd., Tokyo Pharmaceutical Institute, Higashimurayama 189-0022, Tokyo.

³ Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030 USA,.

⁴ Pharmaceuticals and Medical Device Agency, Chiyoda-ku 100-0013, Tokyo.

⁵ Yamazaki College of Animal Health Technology, Hachioji 192-0364, Tokyo.

* Present address: Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., Department of Research and Development, Toshima-ku 170-8634, Tokyo.

ABSTRACT

Whey acidic protein (WAP) has been identified in a wide range of species as a major whey protein in milk. Our previous studies have shown that the mouse WAP inhibits the proliferation of mammary epithelial cells, and has a function of reducing tumorigenesis and invasion of MCF-7 cells derived from human breast cancer. In some species including humans, however, WAP is not synthesized in the mammary gland. In this study, to investigate an available use of human WAP as a biological substance, we restored the nonfunctional human *WAP* gene and analyzed its function. Comparative DNA database analysis of the nonfunctional human *WAP* gene with known *WAP* genes confirmed the presence of critical nucleotide substitutions, deletion and insertion within the coding region of human *WAP* gene. The nucleotide mutations (three points) were restored using a site-directed mutagenesis system (Invitrogen, CA, USA). DNA sequencing showed that the nonfunctional human *WAP* gene was successfully restored. Transfection of the restored human *WAP* gene into MCF-7 cells induced a significant decrease in their proliferating and invasive abilities. The human *WAP*-expressing MCF-7 cells also showed a significant decrease in tumorigenesis in nude mice after the subcutaneous transplantation. The present study demonstrated that the restored human *WAP* gene displayed its biological function.

Key words: Gene restoration, MCF-7 cells, Milk protein, Tumorigenesis, WAP

連絡先：東條 英昭

現所属：ヤマザキ動物看護短期大学

〒192-0364 東京都八王子市南大沢 4-7-2

(email: h-tojo@yamazaki.ac.jp)

2011 年 5 月 2 日受領、2011 年 6 月 23 日受理

要 約

乳清酸性タンパク質 (Whey Acidic Protein: WAP) は広く動物種の乳汁中に同定されている。我々はこれまでの研究から、マウス WAP が乳腺上皮細胞やヒト乳癌由来細胞 (MCF-7) に対し増殖抑制作用を示すことを明らかにした。しかし、ヒトを含むある種の動物では WAP 遺伝子が発現していない。そこで本研究では、ヒト WAP の有用性を探るために、機能喪失ヒト WAP 遺伝子を復元し、ヒト WAP の機能について解析した。DNA データベース解析により、機能喪失ヒト WAP 遺伝子内に 4 ヶ所の塩基置換、欠失ならびに挿入が確認された。そこで、poly(A) 付加シグナルにおける一塩基 (T) 挿入を除く 3 ヶ所の変異について復元した。復元ヒト WAP 遺伝子を MCF-7 細胞 (ヒト乳癌由来) に導入し、遺伝子発現を調べた結果、転写ならびに WAP の産生が確認された。つぎに、ヒト WAP が MCF-7 細胞に及ぼす影響を解析した結果、増殖抑制ならびに浸潤抑制作用が認められた。さらに、復元ヒト WAP 発現細胞株 (MCF-7) を、ヌードマウスへ移植した実験から、ヒト WAP 遺伝子の発現により MCF-7 細胞の腫瘍形成能が抑制されることが認められた。

緒言

動物の乳汁中に分泌される主要なタンパク質には、 α 、 β -カゼイン、 α 、 β -ラクトアルブミン、乳清酸性タンパク質 (Whey Acidic Protein: WAP) などが知られている。そのうち WAP はマウス (Piletz と Ganschow 1981; Hennighausen と Sippel 1982a; Hobbs ら 1982)、ラット (Hennighausen ら 1982)、ラクダ (Beg ら 1984)、ウサギ (Devinoy ら 1988)、ブタ (Simpson ら 1998)、ワラビー (Simpson ら 2000)、アカゲカンガルー (Nicholas ら 2001) などの乳汁中に同定されている。

WAP は、WAP four disulfide core (WFDC) ドメインが 2~3 個直列に連なった構造をしており (Hennighausen と Sippel 1982b; Simpson ら 2000)、また、WFDC ドメインは、N 末端側に WAP モチーフ (KXGXCP) をもち、4 対のジスルフィド結合を形成している (Hennighausen と Sippel 1982b)。この WAP ドメイン構造がセリンプロテアーゼインヒビターの構造と類似していることから、WAP はある種の分泌性プロテアーゼインヒビターであろうと推測されてきた (Dandeker ら 1982; Hennighausen と Sippel 1982b; Simpson ら 1998; Ranganathan ら 1999; Simpson ら 2000)。

我々は、これまで、培養細胞系ならびにトランスジェニックマウスを用いた一連の研究から、WAP は乳腺上皮細胞や乳癌由来上皮性細胞の増殖に対し抑制的に働くことを明らかにした (Wen ら 1995; Hase ら 1996; Ikeda ら 2002; Ikeda ら 2004; Nukumi ら 2004; Iwamori ら 2005; Nukumi ら 2005; Nukumi ら 2007a; Nukumi ら 2007b)。しかし、ヒトでは、WAP 遺伝子のプロモーター領域は、ホルモン感受性を有しているのに対し、コード領域における複数の塩基変異により発現していないことが判明している (Nukumi ら 2006)。

そこで、本研究では、機能喪失ヒト WAP 遺伝子の

復元を試み、ヒト WAP の生理活性物質としての有用性を調べた。

材料および方法

1. バイオインフォマティクスによる解析

本研究では、ヒト WAP 遺伝子について以下のホームページを利用し、バイオインフォマティクスによる解析を行った。すなわち、Google (バイオインフォマティクス関係検索ツール)、GenBank (核酸配列データベース)、Ensemble (ヒトゲノムデータベース)、Procrustes (スプライシングサイト予測)、CLUSTALW (マルチプルアライメント)、Compute pI/Mw tool (アミノ酸分子量予測)、SignalP (シグナルペプチドと解裂部位の予測)、ExPASy (各種データベースとソフトウェア)、NCBI (各種データベースとソフトウェア)、PubMed (文献データベース) である。なお、各種ホームページのアドレスの記載は省略した。

2. ヒト WAP 遺伝子 (ゲノム) のクローニング

ヒト WAP 遺伝子の配列はヒト白血球から抽出した DNA を鋳型とし、5'-CCA-CCA-TAC-ACT-GTC-TCT-TC-3' (forward) および 5'-AAT-TAG-CAG-CCG-TAG-AAG-GC-3' (reverse) をプライマーとして、LA Taq (TAKARA BIO, Ootsu, Japan) を用いて PCR で増幅した (Fig.1)。PCR は 94℃ 1 分間、56℃ 1 分間、72℃ 1 分間、35 サイクルの条件で行なった。PCR 産物は 1% アガロースゲル電気泳動後に GENECLAN II Kit (Bio101 Systems, CA, USA) を用いて回収および精製した。精製 PCR 産物は pGEM-TEasy (Promega, WI, USA) にクローニングし、シークエンシング用キット (Thermo Sequence Cycle Sequencing Kit P/N 78500, USB Corp, OH, USA) を用い、DNA シークエンサー (ALF Express,

Fig. 1. Schematic structure of nonfunctional human WAP gene and restored bases. ex1-ex3: exon1-exon4, TAG: stop codon, stop: stop codon (TGA). Vertical arrows indicate the restored bases against substituted and deleted ones. Arrows F and R indicate forward (F) and reverse (R) primers used for cloning the nonfunctional human WAP gene.

Amersham-Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan) により塩基配列を決定した。なお、シーケンシング用プライマーには、5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT-3'(forward) と 5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC-3' (reverse) を用いた。

3. ヒト WAP 遺伝子の復元

ヒト WAP 遺伝子の配列における塩基置換および塩基欠失の復元は、前述のヒト WAP 遺伝子 (ゲノム) を基に Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen, CA, USA) を用いプロトコルに従って行った。復元反応に用いたプライマーは、5' 側の 15-20 塩基を重複させ、forward のプライマーのみに復元部位を挿入した 30 塩基 (復元部位を含まない) から成るプライマーを使用した。まず、エキソン 1 における開始コドンの一塩基置換 (ATA) を ATG へ復元し、シーケンシングで確認した。つぎに、開始コドンが復元されたプラスミド DNA に、エキソン 2 のスプライシング部位における一塩基欠失 (ΔG) に G を挿入した。最後に、開始コドンおよびスプライシング部位の変異が復元されたプラスミド DNA に、エキソン 3 における終止コドンへの一塩基置換 (TAG) をマウス WAP 遺伝子の塩基配列に準じて TCT へ復元した (Fig. 1)。得られた復元 PCR 産物の塩基配列は、前述と同様にシーケンシングにより確認した。復元用には以下のプライマーを用いた。

ATA の ATG への復元: 5'-GGG-AAT-TCA-GAT-TCC-ACC-ATG-CAC-ACT-GTC-TCT-TCA-3' (forward) および 3'-CGG-TAC-AAG-GGG-CGC-CCT-TAA-GTC-TAA-GGT-GGT-A-5' (reverse)、欠失 G の復元: 5'-CTG-CAA-AAC-CCC-ACC-ATT-GGG-TAA-TAC-TAA-CAA-3' (forward) および 3'-GGA-CGT-CGG-GGA-CGT-TTT-GGG-GTG-GTA-ACC-5' (reverse)、TAG の TCT への復元: 5'-GCT-CCA-TGG-ACG-GCG-GGT-GTC-TGG-GAG-AAA-AG-3' (forward) および 3'-TCG-TCT-CAC-TCA-

CGA-GGT-ACC-TGC-CGC-CCA-CA-5' (reverse)。

4. ヒト WAP 発現ベクターの構築

まず、pGEM- 復元ヒト WAP 遺伝子 (ゲノム) からサブクローニングし、pCX- 復元ヒト WAP 遺伝子 (ゲノム) 発現ベクターを構築した (pCX/restored hWAP: Fig. 2)。

5. ヒト WAP 発現細胞株の樹立

直鎖状にした pCX/restored hWAP を MCF-7 細胞に導入し、ヒト WAP を安定的に発現する細胞株を樹立した。MCF-7 細胞の培養液は DMEM (GIBCO BRL, MD, USA) に NaHCO₃ を 3.7 g/l、牛胎児血清 FBS (SAFC Biosciences, KS, USA) を 10%、ペニシリンを 10⁶ U/l、ストレプトマイシンを 10 mg/l となるように調整した。MCF-7 細胞への遺伝子導入は、トランスフェクション試薬 (FuGENE™; Roche Applied Science, CT, USA) を用い、既報 (Nukumi ら 2007b) に従って行った。遺伝子導入操作の 48 時間後に、ネオマイシン選択性培地で培養し、培養液を 2 日間おきに交換し 2 週間培養した。ついで、G418 耐性細胞のみを選別し、継代することにより細胞数を増やし、ヒト WAP 遺伝子を安定して発現する細胞株 (以後、ヒト WAP 発現細胞株とする) を樹立した。実験に用いた細胞は、1.0 × 10⁶ 個を DMSO が 10% 濃度になるように調整し、-80℃ で一夜凍結後、液体窒素中に保存した。

6. 復元ヒト WAP 遺伝子の転写の確認とヒト WAPcDNA の作製

ヒト WAP 発現細胞株を培養し、72 時間後に TRIZOL (Invitrogen, CA, USA) を用いて細胞から RNA を抽出し、エタノール沈殿により精製した。ついで、RT-PCR により cDNA を作製した。PCR 産物の塩基配

Fig. 2. pCX/restored human WAP (genome) expression vector.

Fig. 3. Expression vector harboring pcDNA3.1/V5His-restored human WAPcDNA.
The expression vector contains CMV promoter, V5 epitope that labels with marker of protein expression, 6×His tag, and the restored human WAPcDNA.

列はシーケンシングにより確認した。復元ヒト WAP 遺伝子の配列増幅用プライマーには、5'-CCA-CCA-TGC-ACT-GTC-TCT-TCA-GC-3' (forward) および 5'-AAT-TAG-CAG-CCG-TAG-AAG-GC-3' (reverse) を用いた。

7. ヒト WAP の同定

ヒト WAP に対する抗体が存在しないため、WAP を確認する方法として、ヒト復元 WAPcDNA 断片を V5-epitope および 6×His タグ付発現プラスミドにサブクローニングし、発現プラスミドを TOPO クローニングシステムにより構築した (pV5-His-hWAP ; Fig.3)。すなわち、ヒト WAPcDNA を pcDNA3.1-V5-His-TOPO ベクターと 5 分間室温で混合し、トランスフォーメーションを行った。得られた pcDNA 3.1/ V5-His- 復元ヒト WAP (cDNA) (pV5-His-hWAP, Fig.3) を直鎖化した後、トランスフェクション試薬 (FuGENE™ ; Roche Applied Science) を用いて MCF-7 細胞にトランスフェクションし、ヒト WAP 遺伝子を安定して発現する細胞株を樹立した。この細胞株を 24 時間培養し、細胞内タンパク質抽出試薬 (CytoBuster Protein Extraction Reagent ; Novagen, NJ, USA) を用いプロトコールに従って細胞からタンパク質を抽出した。また、細胞培養液中のヒト WAP の検出には、培養 24 時間後の培養液を回収し、セントリコン YM-10 (Amicon, NC, USA) を用いて限外ろ過し 50 倍濃縮したものをを用いた。ヒト WAP の検出は、ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を用い既報 (Nukumi ら 2004) に従って行った。

8. 復元ヒト WAP の機能解析

我々はこれまでの研究 (Nukumi ら 2005 ; Nukumi ら

2007) から、マウス WAP が乳癌由来上皮細胞の増殖ならびに細胞浸潤を抑制することを確認している。そこで、本研究では、ヒト WAP が MCF-7 細胞の細胞増殖性、細胞浸潤性、さらにはヌードマウスにおける腫瘍形成能に及ぼす影響について解析した。

1) ヒト WAP 発現細胞株の培養液が MCF-7 細胞の増殖性に及ぼす解析

前述のヒト WAP 発現細胞株 (WAP10, WAP54, WAP56)、またはプラスドのみを導入した Mock 細胞株 (対照 : Mock27) をシャーレ (Φ 100 mm) で 80% コンフルエントになるまで培養し、48 時間後にそれぞれの培養液を回収した。野生型 (WT) MCF-7 細胞を予めシャーレ (Φ 60 mm) に 1×10^4 個を播き 48 時間培養後、回収した培養上清液に置換した。培養液の置換後、経時的 (24 ~ 72 時間) に細胞数を測定した。

2) ヒト WAP 発現細胞株の細胞浸潤性の解析

まず、トランスウェル (pore size: $8 \mu\text{m}$) にマトリゲル ($25 \mu\text{g}$ / フィルター) を敷き、 37°C で 0.5 ~ 1 時間培養した。つぎに、上層の培養液を 0.1% BSA FBS-Free-DMEM に、一方、下層を 1% BSA 20% FBS DMEM にそれぞれ置換した。さらに、上層にはヒト WAP 発現細胞株 (WAP56)、または Mock 細胞株 (Mock27) を 6.0×10^4 個播き、48 時間培養後、3% PFA-PBS で固定し、クリスタルバイオレットで染色後、下層に浸潤した細胞数を測定した。

3) 復元ヒト WAP 発現細胞株のヌードマウスへの移植と腫瘍の測定

ヌードマウスは、日本エスエルシー (静岡) より購入した 7 週齢の KSN/Slc (雌) 20 匹を用いた。マウスは、マウス飼育室 (温度: $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 湿度: 40~60%, 照明: 13 時間) に設置した簡易クリーンベンチ内でフィルターキャップを装着した PC ケージで飼育した。飼育機材は全て滅菌したものを使用し、滅菌水および γ 線照射滅菌飼料を給与した。飼育ケージなどの機材の滅菌は、東京大学獣医公衆衛生学教室伊藤喜久治教授の協力を得て行った。ヒト WAP 発現細胞株 (WAP56) と Mock 細胞株 (Mock27) を大量培養し、細胞濃度を 5.0×10^6 個 / $100 \mu\text{l}$ に調整した。細胞混合液 $100 \mu\text{l}$ を注射針 (23 G) で乳腺および背部皮下に注射した。実験期間中は 1 週間毎 (15 時 ~ 16 時) に体重を測定した。細胞移植後 50 日目にマウスを安楽死させ、腫瘍の長径 (L) と短径 (W) を測定し、その値を計算式 $\text{TV} = (\text{L}$

$\times W^2)/2$ (野村ら 1983) に当てはめて推定腫瘍重量 (TV) を算出した。また、腫瘍組織の一部 (60 mg) はホモジェナイズし、QIAGEN RNeasy MINI (Promega) を用いて RNA を抽出し、RT-PCR により復元ヒト WAP mRNA を確認した。さらに、一部はパラフィン切片 (6 μ m) の作製に使用し、切片はヘマトキシリン・エオジンで染色し、光学顕微鏡で観察した。なお、ヌードマウスを使用した動物実験については、東京大学農学部動物実験委員会に実験計画書を提出し、東京大学動物実験マニュアル (現: 東京大学動物実験実施規則) に従って実施した。

結果

1. バイオインフォマティクスによる解析結果

各種のデータベースを基にヒト WAP 遺伝子について解析した結果、ヒト WAP 遺伝子では、一塩基置換 (2ヶ所)、一塩基欠失 (1ヶ所) および一塩基挿入 (1ヶ所) が確認された。すなわち、開始コドン (ATG) の ATA への置換、エキソン 2 のスプライシングサイトにおける一塩基 (G) の欠失、エキソン 3 における終止コドン (TAG) の存在、Poly(A) 付加シグナルにおける一塩基 (T) の挿入が認められた。また、ヒトゲノム DNA を鋳型に PCR 反応によりヒト WAP 遺伝子の配列を増幅し、その PCR 産物の塩基配列をシーケンシングした結果、公開されているヒトゲノム DNA データベース上の塩基配列と 100% 一致し、データベース解析で認められた 4ヶ所の塩基配列の変異も確認された。一方、WAP ドメインの特徴であるシステインの数 (8個) やそれらの位置は良く保存されていた。さらに各 WAP ドメインの N 末端に存在する WAP モチーフやシグナルペプチド (19 アミノ酸残基) の存在も確認された (Fig.1)。

2. ヒト WAP 遺伝子の復元の結果

本研究では、Poly(A) 付加シグナルにおける一塩基 (T) 挿入を除く他の 3ヶ所の変異について復元を行った。機能喪失ヒト WAP 遺伝子 (ゲノム) を鋳型にし、復元 PCR 反応 (「材料および方法」を参照) により得た PCR 産物の塩基配列をシーケンシングした結果、3ヶ所の変異がそれぞれ復元され、また全体の塩基配列が正確に増幅されていることが確認された (Fig.1)。

3. 復元ヒト WAP 遺伝子の発現

1) 転写

ヒト WAP 発現細胞株から抽出した RNA を基に

RT-PCR を行った結果、397bp の位置にヒト WAP mRNA が確認された (Fig.4A)。

2) ヒト WAP

復元させた WAP 遺伝子が WAP を発現するかどうかを確認するために、前述の WAP 発現細胞株から抽出した細胞質抽出液を V5-epitope 抗体を用いて Western blotting により解析した。その結果、ヒト WAP の予測分子量 (Swiss-Prot/TrEMBL) に相当する位置 (18.7kDa) にバンドが検出された (Fig.4B)。なお、ヒト WAP 発現細胞株の培養液の解析では、約 23kDa の位置にバンドが確認された。これは、濃縮 (50 倍) によるヒト WAP の変性が考えられるが、理由は不明である。

4. 復元ヒト WAP の機能

本研究では、復元ヒト WAP 遺伝子の発現が MCF-7 細胞の細胞増殖性、細胞浸潤性、さらには、腫瘍形成能におよぼす影響について解析した。

ヒト WAP 発現細胞株 (WAP10, WAP54, WAP56) および Mock 細胞株 (Mock27) を培養した上清液を用いて MCF-7 細胞を培養し、経時的に生細胞数を計測した。その結果、ヒト WAP 発現細胞株の培養液で培養した MCF-7 の増殖性は Mock 細胞株の培養液で培養した場合に比較して、培養 24 時間後で既に有意に低い値を示した (Fig.5)。この結果は、ヒト WAP が培養液中へ分泌され、細胞増殖抑制作用を有していることを示す

Fig. 4. Expression of the restored human WAP gene in the cloned MCF-7 cells.

A: RT-PCR of the transcripts from the restored human WAP gene. B: Western blotting of the extract of cloned MCF-7 cells transfected with pV5-His-hWAPcDNA. The positive signal was detected at the predicted molecular size (18.7 kDa) of human WAP. WT: wild-type cells without transfection, Mock: cells transfected with plasmid only.

Fig. 5. Effect of the medium cultured human WAP-expressing MCF-7 cells on the proliferation of wild-type MCF-7 cells. WT: wild-type cells without transfection. WAP27: cloned cells that transfected with vector only. WAP10, WAP 54, WAP 56 : strains of human WAP-expressing cloned cells. Vertical bars: S.D. of the means.

Fig. 6. Reduction in invasiveness of human WAP-expressing MCF-7 cells. The number of invaded cells was significantly lower in the WAP- expressing cloned cells (WAP10, WAP54 and WAP56) than in the cloned mock cells (Mock27). Vertical bar: S.D. of the mean. *: $p<0.05$, **: $p<0.025$.

ものである。つぎに、ヒト WAP 発現細胞株 (WAP56) の細胞浸潤性についてトランスウェルを用いて解析した。その結果、WAP56 は Mock27 に比較し、有意に細胞浸潤性の低いことが認められた (Fig.6)。

さらに、ヒト WAP 発現細胞株をヌードマウスへ移植し、その腫瘍形成能について調べた。すなわち、WAP 56 および Mock27 をそれぞれヌードマウスの乳腺および背部皮下の 2 ヵ所に移植し、細胞注入後 50 日目に腫瘍の形成を解析した。その結果、Mock27 を移植した 10 匹中 9 匹で腫瘍の形成が認められ、そのうち 8 匹で背部皮下と乳腺とに腫瘍が形成され、1 匹で背部でのみ腫瘍が形成されていた。これに対して、WAP56 を移植した場合には、10 匹のうち 3 匹でしか腫瘍の形成が認められなかった。しかも 3 匹ともに背部

Fig. 7. Estimated volume of the tumor formed in nude mice after subcutaneous transplantation of the human WAP-expressing cloned MCF-7 cells. The length and the wide of tumor were measured, and the values were applied to the calculation formula [$TV = (L \times W^2/2)$]. The volume of the tumor formed by the WAP expressing-cloned cells (WAP) was significantly smaller than that formed by the cloned mock cells (Mock). Vertical bars: S.D. of the means. *: $p<0.025$.

皮下には腫瘍が確認されず、乳腺でのみ腫瘍が形成されていた。

つぎに、推定腫瘍重量を算出した結果、乳腺における腫瘍重量が、Mock27 移植マウスに比べ、WAP56 移植マウスで有意 ($p<0.025$) に小さかった (Fig.7)。なお、実験期間中の体重の推移は、Mock27 移植マウスと WAP56 移植マウスとの間で差は認められなかった。

また、全ての腫瘍組織から RNA を抽出し、RT-PCR で確認した結果、復元ヒト WAP 遺伝子の mRNA が確認された。さらに、腫瘍の組織学的観察から、典型的な腫瘍像が確認された。

考察

WAP は乳汁中の単なる栄養成分であるだけでなく、乳腺細胞 (Ikeda ら 2002 ; Ikeda ら 2004 ; Nukumi ら 2004) および乳癌由来細胞 (Nukumi ら 2005 ; Nukumi ら 2007a ; Nukumi ら 2007b) に対し、特異的に増殖抑制作用を示ことが明らかにされた。また、ヒト乳癌由来細胞である MCF-7 細胞に対しては細胞増殖抑制ならびに浸潤抑制作用を有することが明らかにされている (Nukumi ら 2005 ; Nukumi ら 2007b)。さらには、細菌 (*S. aureus*) に対する抗菌作用を有することも報告されている (Iwamori ら 2010)。

このように WAP は重要な生理的機能を有するにもかかわらず、ヒトでは発現されていない。その理由として考えられるのは、ヒトには WAP ファミリー遺伝子が多数存在することが挙げられる。WAP ファミリー

遺伝子である *SLPI* や *Elafin* は、ヒトにおいて癌の浸潤抑制作用 (Ming ら 1995) の他に抗炎症作用、抗バクテリア作用、抗菌作用、抗レトロウイルス作用 (Wiedow ら 1990 ; Zhang ら 1995 ; Moriyama ら 1998 ; Ashcroft ら 2000) などの機能を持つことが報告されている。また、ヒトの乳汁中には WAP ドメインを 2 個持つ SLPI が微量ながら含まれており、HIV から母子感染の防御に関与していることが報告されている (Farquhar ら 2000)。したがって、ヒト WAP は、分子進化の過程で他の WAP ファミリー遺伝子に機能を代替された可能性が考えられる。WAP 遺伝子と同様に進化の過程で遺伝子発現が喪失した遺伝子としては、*Trappin* が挙げられる (Furutani ら 1998)。Trappin は、トランスグルタミナーゼ基質ドメインと阻害領域 (WAP モチーフ) を合わせもつ天然の融合タンパク質であり、抗菌作用を有することで知られている (Baranger ら 2008)。この Trappin はヒト、ブタ、ウシでは発現しているが、マウスおよびラットでは発現していない (Furutani ら 1998)。

本研究では、復元ヒト WAP がマウス WAP (Nukumi ら 2005 ; Nukumi ら 2007b) に比べ、ヒト乳癌細胞 (MCF-7) に対してより強い細胞増殖抑制作用を示した。その理由は、WAP と供試細胞とが同種のヒトであることが考えられる。この結果は、復元ヒト WAP が生理活性物質として十分に機能していることを示している。Nukumi ら (2007a) は、マウス WAP の乳腺上皮細胞に対する増殖抑制作用の分子機構を知るために詳細な実験を行い、WAP は細胞周期に重要な役割を果たしているサイクリン D1 の発現を抑制し、その結果、細胞周期の G1 から S 期への移行が遅延することを明らかにした。

近年、細胞の癌化、癌細胞の増殖、浸潤さらには転移に対するプロテアーゼ (タンパク質分解酵素) の関与が重要視されている。特にトリプシン、プラスミンなどのセリン系プロテアーゼは、正常細胞の形態変化に関与すること、細胞の接触阻害作用を抑制し再び細胞分裂を引き起こすことに関与することが知られている (Eddy 2009)。また、セリンプロテアーゼインヒビターである Maspin は、乳癌や前立腺癌の進行に関与しており、過剰発現により乳癌の進行を抑制し、転移を抑制することが報告されている (Zhang ら 2000)。

我々は、これまでの研究から、マウス WAP が乳腺細胞ならびに乳癌細胞に対して増殖抑制作用を示すことを明らかにしたことは前述した通りである。本研究では、復元ヒト WAP がヒトの乳癌由来細胞である

MCF-7 細胞の増殖だけでなく、細胞浸潤に対しても抑制作用を示すことが示された。さらには、MCF-7 細胞の腫瘍形成能に対しても抑制作用を示すことが認められた。

以上、本研究の結果は、塩基置換あるいは欠失によって機能喪失したヒト WAP 遺伝子を復元できることを示すとともに、復元したヒト WAP 遺伝子由来の WAP をヒト乳癌に対する抑制物質として利用できる可能性を示唆するものである。

文献

- Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell- Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song XY, Wahl SM. 2000. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nature Medicine*, 6: 1147-1153.
- Baranger K, Zani ML, Chandenier J, Dallet-Choisy S, Moreau T. 2008. The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS Journal*, 279: 2008-2020.
- Beg OU, Bahr-Lindstrom HV, Zaidi ZH, Jornvall H. 1984. A small camel-milk protein rich in cysteine/half-cysteine. *Bioscience Reports*, 4: 1065.
- Dandekar AM, Robinson EA, Appella E, Qasba PK. 1982. Complete sequence analysis of cDNA clones encoding rat whey pospoprotein: homology to a proteinase inhibitor. *Proceedings of National Academic Science USA*, 79: 3987-3991.
- Devinoy E, Hubert C, Jolivet G, Thepot D, Clergue N, Desaleux M, Servely JL, Houdebine LM. 1988. Recent data on the structure of rabbit milk protein genes and on the mechanism of the hormonal control of their expression. *Development*, 28: 1145-1164.
- Eddy AA. 2009. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 101: 656-664.
- Farquhar C, Vancott TC, Mbori-Ngacha DA, Horanil L,

- Bosire RK, Kreiss JK, Richardson BA, John-Stewart GC. 2000. Salivary secretory leucocyte protease inhibitor is associated with reduced transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast milk. *Journal of Infectious Disease*, 15: 1173-1176.
- Frutani Y, Kato A, Yasue H, Alexander LJ, Beattie CW, Hirose S. 1998. Evolution of the trappin multigene family in the Suida. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 124: 491-502.
- Hase W, Seo BB, Tojo H, Tanaka S, Tachi C. 1996. Transgenic mice overexpressing foreign whey acidic protein (WAP) gene driven by methallothionein promoter. *Journal of Reproduction and Development*, 42: 265-271.
- Hennighausen LG, Sippel AE. 1982a. Characterization and cloning of the mRNAs specific for the lactating mouse mammary gland. *European Journal of Biochemistry*, 125: 131-141.
- Hennighausen LG, Sippel AE. 1982b. Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of four-disulfide core protein. *Nucleic Acids Research*, 10: 2677-2684.
- Hennighausen LG, Sippel AE, Hobbs AA, Rosen JM. 1982. Comparative sequence analysis of the mRNAs coding for mouse and rat whey protein. *Nucleic Acids Research*, 10: 3733-3744.
- Hobbs AA, Richards DA, Kessler DJ, Rosen JM. 1982. Complex hormonal regulation of rat casein gene expression. *Journal of Biochemistry*, 257: 3598-605.
- Ikeda K, Kato M, Yamanouchi K, Naito K, Tojo H. 2002. Novel development of mammary glands in the nursing transgenic mouse ubiquitously expressing WAP gene. *Experimental Animals*, 51: 395-399.
- Ikeda K, Nukumi N, Iwamori T, Oosawa M, Naito K, Tojo H. 2004. Inhibitory function of whey acidic protein in the cell-cycle progression of mouse mammary epithelial cells (Eph4/K6 cells). *Journal of Reproduction and Development*, 50: 87-96.
- Iwamori T, Oosawa M, Nukumi N, Sudo K, Kano K, Naito K, Tojo H. 2005. Aberrant development of mammary glands but precocious expression of β -casein in transgenic females ubiquitously expressing WAP transgene. *Journal of Reproduction and Development*, 51: 579-592.
- Iwamori T, Nukumi N, Itoh K, Kano K, Naito K, Kurohmaru M, Yamanouchi K, Tojo H. 2010. Bacteriostatic activity of whey acidic protein (WAP). *Journal of Veterinary Medical Science*, 72: 621-625.
- Ming Z, Zhiqiang Z, Nicolai M, Ruth S. 1995. Differential expression of elafin in human normal mammary epithelial cells and carcinomas is regulated at the transcriptional level. *Cancer Research*, 55: 2537-2541.
- Moriyama A, Shimoya K, Kawamoto A, Hashimoto K, Ogata I, Kunishige I, Ohashi K, Azuma C, Saji F, Murata Y. 1998. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in seminal plasma: SLPI restores sperm motility reduced by elastase. *Molecular Human Reproduction*, 4: 946-950.
- Nicholas KR, Fisher JA, Muths E, Trott J, Janssens PA, Reich C, Shaw DC. 2002. Secretion of whey acidic protein and cysteine is down regulated at mid-lactation in the red kangaroo (*Macropus rufus*). *Comparative Biochemical Physiology*, 129: 851-858.
- 野村達次・櫻井欽夫・稲葉 寛 編著. 1983. スー ドマウスと抗癌評価. 癌と化学療法社、東京.
- Nukumi N, Ikeda K, Oosawa M, Iwamori T, Naito K, Tojo H. 2004. Regulatory function of whey acidic protein in the proliferation of mouse mammary epithelial cells in vivo and in vitro. *Developmental Biology*, 274: 31-44.
- Nukumi N, Iwamori T, Naito K, Tojo H. 2005. Whey acidic protein (WAP) depresses the proliferation of mouse (MMT) and human (MCF-7) mammary tumor cells. *Journal of Reproduction and Development*, 51: 649-656.

- Nukumi N, Seki M, Iwamori T, Yada T, Naito K, Tojo H. 2006. Analysis of the promoter of mutated human whey acidic protein (WAP) gene. *Journal of Reproduction and Development*, 52: 315-320.
- Nukumi N, Iwamori T, Kano K, Naito K, Tojo H. 2007a. Whey acidic protein (WAP) regulates the proliferation of mammary epithelial cells by preventing serine protease from degrading laminin. *Journal of Cell Physiology*, 213: 793-800.
- Nukumi N, Iwamori T, Kano K, Naito K, Tojo H. 2007b. Reduction of tumorigenesis and invasion of human breast cancer cells by whey acidic protein (WAP). *Cancer Letters*, 252: 65-74.
- Piletz JE, Ganschow RE. 1981. Genetic variation of milk proteins in mice. *Biochemical Genetics*, 19: 1023-1030.
- Ranganathan S, Simpson KJ, Shaw DC, Nicholas KR. 1999. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *Journal of Molecular Graphic Model*, 17: 106-113.
- Simpson KJ, Bird P, Shaw D, Nicholas K. 1998. Molecular characterization and hormone-dependent expression of the porcine whey acidic protein gene. *Journal of Molecular Endocrinology*, 20: 27-35.
- Simpson KJ, Ranganathan S, Fisher JA, Janssens PA, Shaw DC, Nicholas KR. 2000. The gene for a novel member of the whey acidic protein family encodes three four-disulfide core domains and is asynchronously expressed during lactation. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 23074-23081.
- Wen J, Kawamata Y, Tojo H, Tanaka S, Tachi C. 1995. Expression of whey acidic protein (WAP) genes in tissues other than the mammary gland in normal and transgenic mice expressing mWAP/hGH fusion gene. *Molecular Reproduction and Development*, 41: 399-406.
- Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E. 1990. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 14791-14795.
- Zhang M, Zou Z, Maass N, Sager R. 1995. Differential expression of elafin in human normal mammary epithelial cells and carcinomas is regulated at the transcriptional level. *Cancer Research*, 55: 2537-2541.
- Zhang M, Shi Y, Magit D, Furth PA, Sager R. 2000. Reduced mammary tumor progression in WAP-TAg/WAP-maspin transgenic mice. *Oncogene*, 19: 6053-6058.