

PI ポリアミドによるカドヘリン遺伝子発現抑制と上皮-間充織転換誘導

日大生産工（院） ○三浦 裕太

日大生産工 日大総研大学院 野呂 知加子

1. 背景と目的

がん細胞の転移過程初期において見られる現象は、上皮細胞の細胞接着性が低下し、移動性をもつ伸長した形の間充織細胞へと形態変化し、下部の細胞外マトリックスへと浸潤していくことである。これは上皮-間充織転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition : EMT) と呼ばれ、発生期の様々な形態形成過程でも見られる基本的なプロセスであり、転移防止の観点から多くの研究がなされている。EMT と関連する主な遺伝子として知られているのは、上皮細胞の細胞接着を担う E-カドヘリンである。

カドヘリン (cadherin) は細胞表面に存在する膜貫通型の糖タンパク質である。カルシウムイオン存在下では 2 量体を形成し、相手方の細胞の同じ分子と結合し細胞接着分子として機能する。典型的なカドヘリンは、細胞外の 5 つのカドヘリンドメイン (カルシウムイオン結合部位を含む)、細胞膜貫通ドメイン、保存性の高い細胞内ドメインから成る。さらに、接着結合 (Adherence Junction) の構築を通じて、細胞間接着の形成と維持に関わっている。細胞内ドメインには α ・ β カテニン等のタンパクが結合し、アクチンフィラメント (細胞骨格) へつながっている。この分子は 1984 年に吉田-野呂知加子と竹市雅俊らによって分子同定、カドヘリンと命名され、細胞接着の形成と維持に関わるだけでなく、細胞内シグナル伝達にも関与していることが示された^{1),2)}。

これまでの研究から、EMT 誘導分子群である slug snail などのカドヘリン抑制遺伝子の発現により、最終的に E-カドヘリンの発現が低下することで細胞は接着性を失い、EMT および転移を開始するとされているが、これらの分子機構にはまだ不明な点が多い。

本研究では、上記とは逆の経路で、細胞接着の変化が EMT を誘導する可能性について検討することを目的とし、ヒト E-カドヘリンプロモーター領域に対して設計した低分子有機化合物 PI (ピロールイミダゾール) ポリアミドを用いて、E-カドヘリン発現抑制と EMT 誘導分子群および細胞接着に関わる種々の遺伝子の発現変化について、ヒト肝臓がん上皮性細胞由来株である HepG2 を用いて調べた。

2. 材料と方法

本研究では、ヒト肝臓がん上皮性細胞由来株 HepG2 を用いた。HepG2 は 1979 年に原発性ヒト肝臓がん (白人男性、15 才) から樹立された細胞株で、がん研究のみならず、グルコース代謝や解毒などの肝臓の機能を模倣する系として国内外で幅広く使われている。

低分子有機化合物 PI ポリアミドは導入試薬なしに細胞核内に浸透し、二重らせん DNA の副溝 (minor groove) 中において U 字型の立体配座をとり、特定の塩基対に、高い親和性と特異性をもって結合することができる。遺伝子の転写促進部位や開始部位等の配列に従って設計すれば、転写因子の結合を阻害し、遺伝子発現の抑制が可能である。

E-Cadherin Repression Induced by PI polyamide and Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition

Yuta MIURA, Chikako YOSHIDA-NORO

すでにE-カドヘリンプロモーター領域配列の、CAAT-box 周辺と E-box 周辺に対して設計した3種のPIポリアミドについて、カドヘリン遺伝子発現抑制効果があることが確かめられ、特許申請がなされている³⁾。

HepG2 細胞播種 (1×10^5 /直径 3.5cm 培養皿) 時に培養液 (10%FBS 1%PS 添加 D-MEM) 中に、3種類のPIポリアミド (HuA HuB HuF) を 5-20 μ M の濃度で添加、またコントロールとして、溶剤である DMSO (Dimethyl sulfoxide) を添加し、継時的 (1~4 日間) に細胞の形態を観察した。種々のポイントで細胞を回収し、RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法により、E-カドヘリンの発現量の変化および、EMT 誘導分子群、細胞接着に関わる種々の遺伝子の発現を調べた。

3. 結果・考察

3 種の PI ポリアミドを添加したところ、細胞増殖阻害とアポトーシスは引き起こされず、濃度依存的に細胞の形態変化がみられた。PI ポリアミドを添加した細胞では、1 日目から細胞間接着がゆるみ間充細胞様となり、3 日目では顕著に間充細胞となった。4 日目では完全に細胞が培養皿上に広がり EMT が観察された (Fig.1)。特に CAAT-box 付近の配列に対して設計した HuF は効果が高かった。

詳細に PI ポリアミド 5 μ M 添加で培養後の過程を追った RT-PCR 結果では、E-カドヘリンの抑制は 1 日目には起こっており、3 日目には EMT 誘導分子群である slug snail twist 等の発現上昇が起こっていることがわかった (Fig.2)。この結果より添加後 2 日目までは、まだ EMT の転換途上にあると考えられ、EMT 誘導分子群の発現変化よりも前のタイミングで、E-カドヘリン遺伝子発現の抑制が起こっており、細胞接着の変化が EMT の最初の引き金となっている可能性が示唆された。これらの EMT 誘導分子群と細胞接着に関わる

種々の遺伝子の発現について、より詳細に検討を行うため、リアルタイム PCR 法による継時定量解析を行った。これらの結果について報告する。

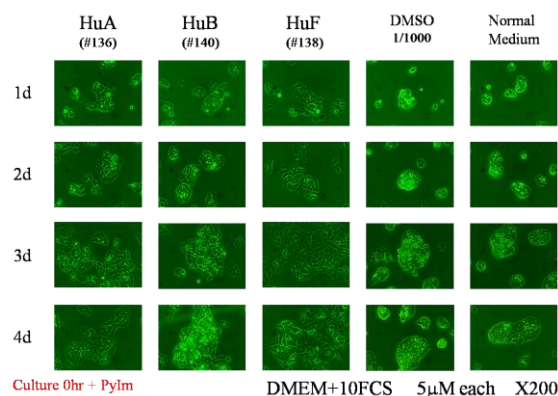


Fig.1 E-カドヘリン PI ポリアミドの効果

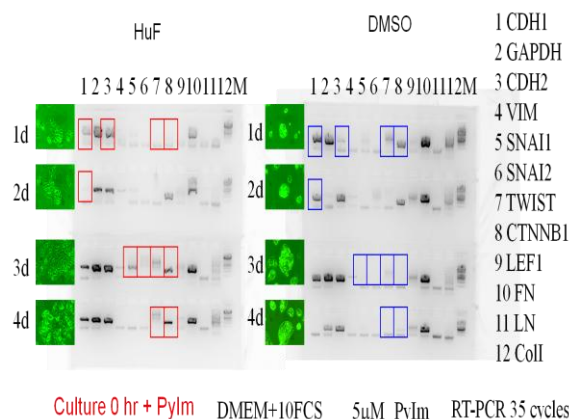


Fig.2 PI ポリアミドの EMT 誘導分子群

参考文献

- 1) Yoshida C, Takeichi M. "Teratocarcinoma cell adhesion : identification of a cell-surface protein involved in calcium -dependent cell aggregation." Cell 28, 217-24,(1982)
- 2) Heasman J, Yoshida-Noro C, and Wylie C. et al. "Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early Xenopus embryos." Cell 79, 791-803. (1994)
- 3) 特願 2007-296070 E-カドヘリン遺伝子発現抑制剤 野呂知加子・福田昇・杉山弘