

上皮-間充織転換におけるカドヘリンの役割

日大生産工 (院) ○高橋 大介
日大生産工 (日大生産工) 野呂 知加子

1. 緒言

本研究は、発生過程やがんの転移などに重要である上皮-間充織転換における細胞接着分子カドヘリンの役割を解明することを目的とする。

カドヘリン (Cadherin) は、細胞の表面に存在する膜貫通型の糖タンパク質である。Cadherin分子は、細胞外の5つのCadherin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、及び保存性の高い細胞内ドメインから成り、細胞膜構造である接着結合の構成分子として細胞接着の形成と維持に関与している。カルシウムイオン存在下では二量体を形成し、他細胞のカドヘリン分子を認識すると、細胞同士を接着させる。細胞内ドメインには $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ カテニン等のタンパクが結合し、細胞骨格に結合することで細胞の形を安定させる。この分子は、カルシウム依存接着システムの一要素として発見され、1984年に、吉田・野呂と竹市によって同定され、Cadherinと命名された。また、細胞や組織の種類によってCadherinの機能が異なり、それが細胞の特異的な接着に関与していることが明らかにされている、胚発生、がんの浸潤・転移、シナプス形成、など様々な生物現象に関わっていることが解明されている。

がんの転移メカニズムは、原発巣でのがん細胞の増殖、原発巣からの離脱と脈管への浸潤、脈管内での移動、転移臓器の血管内皮への接着、転移臓器への浸潤、転移臓器内での増殖、などの過程から引き起こされる。上皮性の細胞は一般的に円筒状で、細胞同士が密に接着し、基底膜と呼ばれる細胞外組織の上にシート状に並んでいる。これに対し、間充織細胞は不規則な形態で、細胞同士が部分的に接着し、自由に移動できる運動性をもつ。転移の初期過程において、上皮細胞の細胞接着性が低下し、周囲に広

がる形態と運動性の間充織細胞へ

と変化してしまう。この転換は上皮-間充織転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition: EMT) と呼ばれる。EMTは1980年代初めにElizabeth Hayらが提唱した、上皮細胞が上皮としての形質を失い間充織の形質を獲得する現象であり、上皮細胞が有する細胞極性の消失、細胞接着の減少、細胞遊走能の亢進、アクチン系細胞骨格の改築を特徴とする。E-cadherinとがんの悪性度には逆相関の関係があることが分かっており、EMTの発生に伴いE-cadherinの発現が抑制されることが知られている。EMTの分子機構には、少なくともSnail、Slug、SIP1などの転写因子がE-cadherinの発現を調節していることや、TGF- β /SmadシグナルによってSnail、SIP1の活性化が明らかとなっているが、その分子機構にはまだ不明な点が多い。

ヒト肝臓がん上皮性細胞由来株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、培養下で均質で高い増殖機能を備え、グルコース代謝や解毒などの肝臓の機能模倣の測定、またシグナル伝達事象の解析など幅広く使われている。

PIポリアミドは、N-methylpyrroleとN-methylimidazoleで主に構成される低分子有機化合物である。その特徴は二重らせんDNAの副溝中においてU字型の立体配座をとり、副溝中のDNA配列に対して、高い親和性と特異性で結合する。実験では、E-cadherin遺伝子発現抑制剤としてプロモーター配列を特異的に認識して結合する、Human E-cadherin F (HuF)、Human E-cadherin B (HuB)、発現抑制が起こらないためコントロールとして用いるHuman E-cadherin Gmis (Hu Gmis)を使用する。

本研究では、PIポリアミドをHepG2細胞に使用して、上記とは逆の経路により、E-cadherin

The role of cadherin in Epithelial to Mesenchymal Transition

Daisuke TAKAHASHI, Chikako YOSHIDA-NORO

の発現低下による細胞接着機能の低下が、EMTを誘導する可能性について検討した。

2. 実験

PIポリアミド HuF、HuB、Hu Gmisを極性溶剤 DMSO (Dimethyl sulfoxide)に溶解した培養液を 37°C で保温した細胞培養液 (500ml D-MEN、10%FBS、1%PS)に最終濃度が10 μ Mとなるように添加した。

5cm培養皿に、PIポリアミド入りの培養液とコントロールとしてDMSOを添加した培養液を加え、HepG2細胞を1 $\times$ 10⁶ cell/mlになるように播種した。細胞の形態を断時的 (1~4日間)に記録し、細胞の回収を行った。細胞の回収には、培養皿から直接細胞を剥ぎとるセルスクレーパーおよび Hanks'Balanced Salt Solution (HBSS) を用いた。

回収した細胞はQIAGEN kitを使用してtotal RNAの抽出を行った。RNA抽出後にRNAの状態を確認するため、分光光度計および電気泳動により、Quality の確認を行った。

Super ScriptTMIII Reverse Transcriptaseを用いてtotal RNAからcDNAを合成した。プライマーには、mRNA の特徴的なポリ (A) 配列に相補的なoligo dTプライマーを用いた。このcDNAを鋳型とし、RT-PCR法により遺伝子発現の確認を行った。PCR増幅にはTaKaRa Ex Taq®を使用し、EMT誘導遺伝子と言われるSNAI1 (Snail)、SNAI2 (Slug)、TWISTなどの遺伝子のプライマーを用いた。

3. 結果および考察

これまでの研究結果から、CAAT-box付近の配列に対して設計されたHuFが最もEMTを引き起こす事が分かっている。Fig. 1はPIポリアミドとDMSOを添加した培養液でHepG2を4日間培養したものである。HuFでは1日目から細胞接着が弛み周囲へ広がり、4日目にはほとんどの細胞で間充細胞への形態変化が観察された。Fig. 2は培養したHepG2細胞のRNAを抽出し、電気泳動によりQualityチェックをしたものである。培養液のみのサンプルとHuF (20 μ M) 添加サンプル以外ではRNAの抽出がうまく行かなかった。今後、細胞回収方法とRNA抽出方法の改善を検討する必要がある。

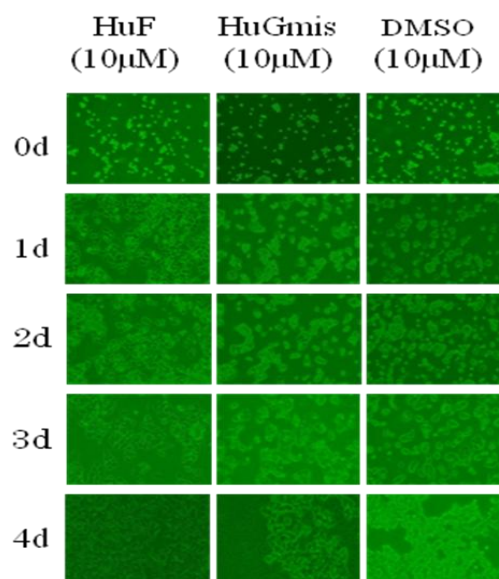


Fig. 1 HepG2に対するPIポリアミドの効果

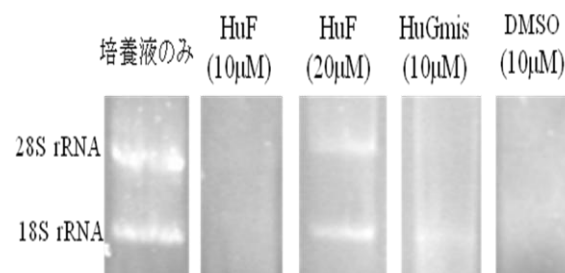


Fig. 2 抽出したRNAのQuality チェック

【参考文献】

- 1) Peter B Dervan, Benjamin S Edelson, *Current Opinion in Structural Biology*, **13**, 284–299 (2003)
- 2) Amanda E. Hargrove, Jevgenij A. Raskatov, Jordan L. Meier, *et al. J. Med. Chem*, **55**, 5425–5432 (2012)
- 3) 特許 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