

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 日大総研大学院 ○野呂 知加子

1. 研究の背景と目的

上皮-間充織転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) は発生中に見られる基本的なプロセスで、上皮細胞の細胞接着が低下し、伸張した形の間充織細胞となり、移動性を獲得して下部の結合組織へと浸潤していく現象である。この現象はガン細胞の転移現象とよく似ており、多くの研究が行われている。EMT と関連する主たる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糖タンパク質で、細胞同士の接着を担っている。典型的なカドヘリン分子は、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り、接着特性の異なる 20 種類ほどのタイプが見つかっている。特に E-カドヘリンは上皮細胞の細胞膜構造である接着結合 (Adherens Junction) 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。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、細胞骨格へとつながっている。カドヘリンは 2 量体を形成し、カルシウムイオン存在下で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。講演者は大学院学生時代に竹市雅俊 (現理研発生再生センター長) とともに、この分子の最初の同定と命名に寄与し¹⁾、またその後も、この分子が細胞接着の形成と維持に関わるだけではなく、細胞内シグナル伝達にも関与していることを示した²⁾。

これまで種々の研究から、slug, snail 等 EMT 関連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、その分子機序の詳細はまだ不明である。

本研究は、がん転移のメカニズム解明をめざし、ゲノム化学の手法を用いて、EMT におけるカドヘリンを中心とした遺伝子ネットワークの解析を行うことを目的とする。ヒト E-カドヘリンプロモーター領域配列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、ヒト肝がん細胞株 HepG2 に対して E-カドヘリン発現抑制を行い、E-カドヘリン発現低下が最初の引き金となって EMT 関連遺伝子群の発現を誘導する可能性について検討を行った。

2. 材料と方法

本実験では、ヒト肝臓癌細胞株 HepG2 を使用した。HepG2 は 1979 年に原発性ヒト肝臓癌 (白人男性、15 才) から樹立された細胞株で、上皮細胞様の付着性細胞である。癌研究のみならず、肝臓の機能を模擬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 (ピロールイミダゾール) ポリアミド (図 1) は導入試薬なしに細胞核内に浸透し、二重らせん DNA の副溝中の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

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

Chikako YOSHIDA-NORO

がその部位に結合するのを阻止して、遺伝子発現を抑制することが明らかにされている。そこで、ヒト E-カドヘリン遺伝子の発現制御部位とされる転写開始点上流-25 から-84 の CAAT 配列前後および E-box 配列を主なターゲットとし、対照となるミスマッチ配列を含め、PI ポリアミドを数種類設計した。

HepG2 は、10% Fetal Calf Serum を含む培養液を用いて、5%CO₂ 下、37℃で培養し、細胞播種時に培養液中に、上記の数種類の PI ポリアミドを、濃度を変えて添加し、継続的に細胞形態を観察した。種々の時間ポイントで細胞を回収し、定量 PCR 法により E-カドヘリン発現量変化および EMT 関連遺伝子群の発現を調べた。対照として、PI ポリアミドの溶剤である Deoxymethylsulfoxide (DMSO)も用いた。

3. 結果と考察

上記の数種類の PI ポリアミドをそれぞれ細胞培養に添加したところ、細胞増殖にはほとんど影響がなかったが、濃度依存的に細胞の形態変化が見られた。特に CAAT-box 付近の配列に対して設計した 2 種は効果が高く、5μM 以下添加で、2 日で細胞間接着がゆるみ、3-4 日で細胞が皿上に広がっていく形 (EMT)が観察された (図 2)。ミスマッチ配列では効果が見られなかった。形態変化の見られた細胞では、EMT 関連遺伝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っていた。従って細胞接着の変化が EMT の最初の引き金になっている可能性が示唆されたので、リアルタイム PCR を用いて、これら遺伝子群の発現の詳細な検討を行った。

この結果から、ヒト E-カドヘリン遺伝子の発現制御部位に対して設計した PI ポリアミドが、ヒト肝がん細胞株において E-カドヘリン遺伝

子発現を抑制し、上皮-間充織転換を引き起こす効果を持つことを確かめたので、特許申請を行った³⁾。現在詳細データを加えて、論文作成を検討中である。

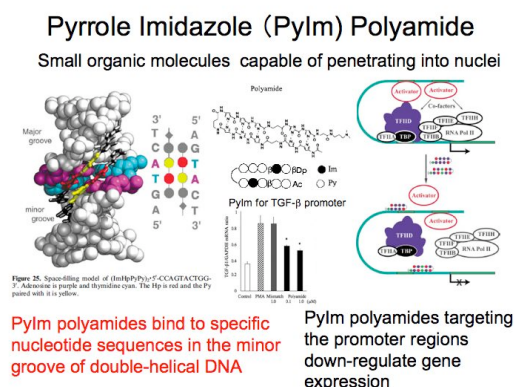


図 1 PI ポリアミドの構造と機能

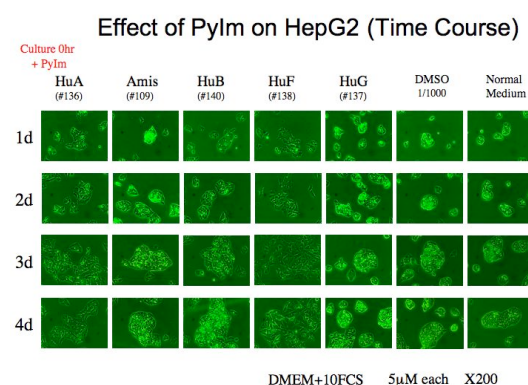


図 1 PI ポリアミドの EMT 効果

参考文献

- 1) Yoshida, C. and Takeichi, M. (1982) Teratocarcinoma cell adhesion :Identification of a cell surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* **28**, 217-224.
- 2) Heasman, J., Yoshida-Noro, C. and Wylie, C. et al., (1994). Overexpression of cadherins and underexpression of b-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* **79**, 791-803
- 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