

カドヘリン発現抑制による上皮-間充織転換誘導の分子細胞生物学的定量解析

日大生産工(院) ○山崎 拓也

日大生産工 野呂 知加子

1. 緒言

上皮-間充織転換(EMT)は、発生中の形態形成やガン細胞の転移に関与する重要な生物学的プロセスで、頂端面と基底面という形態的な極性を持つ上皮細胞から、不規則な形態で運動性を有する間充織細胞へと変化することであり、細胞極性の崩壊や細胞間の接着の解離、基底膜の分解といった一連の細胞反応からなる複合的な現象である。これまでの研究から、slug snail 等 EMT 関連遺伝子の発現により、最終的に細胞接着分子 E-カドヘリンの発現が低下することで EMT が引き起こされるとされているが、その分子機構にはまだ不明な点が多い¹⁾。

我々は、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 (ピロールイミタゾール) ポリアミドをヒト肝がん細胞株 HepG2 に対して与えると、配列依存的・濃度依存的 E-カドヘリン発現抑制および EMT が引き起こされることを見出した。PI ポリアミドは、DNA 二重らせんのマイナーグループに入り込み、塩基配列特異的に認識して DNA に結合する。即ち、E-カドヘリン発現抑制が引き金となる EMT 誘導経路の存在が示唆された。

本研究は、この現象について、分子細胞生物学的に定量解析することを目的とする。

2. 実験

2. 1 使用した細胞

本研究では、ヒト上皮性肝臓がん細胞株 HepG2 (Human hepatocellular carcinoma cell line) 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り、アルブミンや Apo-Eなどの肝臓特異的タンパク質を発現している。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。

2. 2 細胞毒性試験

まず、E-カドヘリン遺伝子発現抑制剤としてプロモーター配列特異的に設計された PI ポリアミド、HuA, HuAR, HuAmis, HuB, HuF を使用した細胞毒性試験を行った。

96well plate に細胞を 2.5×10^3 cell/well で播種し、4 時間培養して細胞を接着させた。その後、培養液を除去し、PI ポリアミド をそれぞれ 20, 10, 5, 1, 0 μ M の濃度で加え、96h 培養した (対象群は溶媒 DMSO のみ等量 培地中に加えた)。

培養後、Cell Viability Kit (Cellomics®) を用いて細胞核、生細胞、死細胞を染色した。測定は 96well plate 上に播種した細胞を特定の蛍光試薬で染色することにより、各 well 中の個々の細胞についての蛍光強度を測定し統計処理することができる ArrayScan (Cellomics®) を使用した。細胞核、生細胞、死細胞の蛍光強度を測定し、生細胞頻度 Viability Percentage を算出した。また、比較のため他の生細胞試験である MTS テトラゾリウム化合物の生物学的還元を原理とする MTS Assay (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, promega を使用) とトリパンブルー色素排除試験法(0.4% Trypan Blue Stain, invitrogen を使用)を行った^{2,3)}。

2. 3 細胞の形態変化解析

E-Cadherin repression by PI polyamide induced epithelial-mesenchymal transition

Takuya YAMAZAKI, Chikako YOSHIDA-NORO

上記 PI ポリアミドを使用し、細胞の形態変化解析を行った。96well plate に細胞を 2.5×10^3 cell/well で播種し4時間培養した。その後、培養液を除去し、PI ポリアミドをそれぞれ 20, 10, 5, 1, 0 μ M の濃度で加え 96h 培養した (対象群は溶媒 DMSO のみ培地中に加えた)。

培養後、Cytoskeletal Rearrangement Kit (Cellomics®) を用いて細胞骨格タンパクである F-actin, tublin を染色した。細胞を4%ホルムアルデヒドを用いて、37℃で15分固定した後、DY554-phalloidinで1時間F-actinを染色し、その後Tubulin抗体 (一次抗体)を1時間反応させた後、DyLight649-二次抗体で30分標識させた。さらに、Whole-Cell Stain Greenで15分間染色し、細胞核もDAPIで染色した (以上、全て室温で操作)。測定はArrayScanを使用し、細胞の形態変化を、核面積に対する細胞骨格面積として定量化した。また、比較のため一般的にEMTの指標として用いるInvasion Assay (BD BioCoat マトリゲルインベーションチャンバーを使用)を行った。

3. 結果および考察

HepG2に対するPIポリアミドを使用した細胞毒性試験を行った結果、PIポリアミドの種類、濃度に関わらず毒性を示さなかった。また、MTS Assay, トリパンブルー色素排除試験法においても毒性はみられなかった。すでに、細胞増殖度にも影響を及ぼさないことは調べており、PIポリアミドには増殖阻害活性および細胞毒性はないことが確かめられた。

次に、細胞の形態変化解析を行った結果、F-actin, tublinの細胞核に対する面積比はそれぞれFig.1, 2のようになった。Fig.1, 2からわかるように、F-actinはPIポリアミドの濃度上昇に伴ない面積比も上昇し、tublinはPIポリアミドの種類、濃度に関わらずほぼ一定の値を示した。この結果は、やはり一般的に知られているEMTに伴うマイクロフィラメント細胞骨格の伸張 (Actin 重合) を定量的に表したことになる。

これらの結果から、PIポリアミドのHepG2に

対する毒性試験および細胞形態変化 (EMT進行度) に関する評価に、Array Scanによる定量解析が有効であり、新規薬剤の定量的スクリーニングに応用可能であることが示唆された。

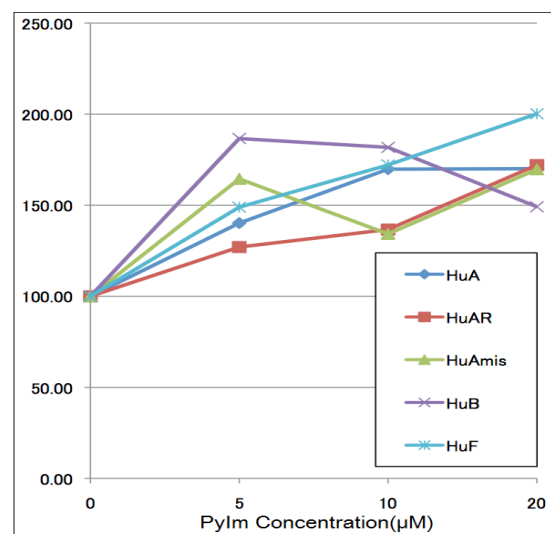


Fig.1 F-actin面積／核面積

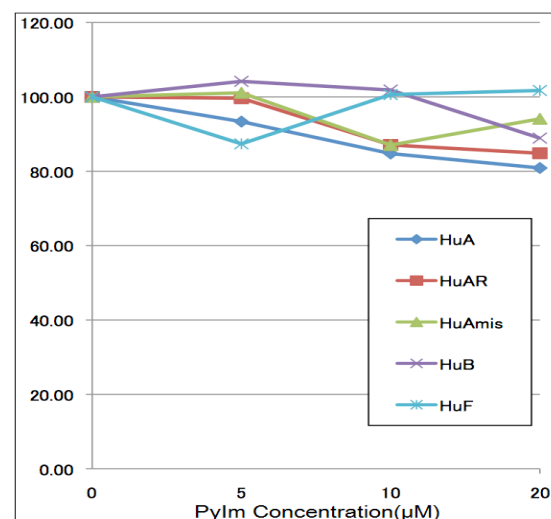


Fig.2 tublin面積／核面積

「参考文献」

- 1) Kang.Y and Massague.J., *Cell* 118, (2004), 277-279.
- 2) Bartrop JA, Owen TC, Cory AH and Cory JG., *Bioorg Med Chem Lett*, (1991) 1: 611.
- 3) Berridge, M.V. and Tan, A.S., *Arch. Biochem. Biophys.*, (1993) 303: 474.