ISSN 2186-5647

5-22

PI ポリアミドによるカドヘリン遺伝子発現抑制と上皮-間充織転換の遺伝子発現解析

日大生産工（院） ○三浦 裕太　日大生産工（院卒） 山崎 拓也
日大生産工　日大総研大学院　野呂 知加子

1. 緒言

上皮-間充織転換 (Epithelial-mesenchymal transition or transformation : EMT) は 1980 年代初めに Elizabeth Hay らが提唱した、上皮細胞が間充織細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程、特に心臓や腎臓、また口蓋形成での重要性がこれまでに明らかとなっている。また、EMT の獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤・転移や線維症との関連も示唆されている*[1]。

上皮細胞の代表的な接着分子である E-cadherin は、細胞間接着に寄与し、癌の悪性度とその発現が逆相関することが知られている。また、EMT 獲得に伴いその発現が抑制されることから、代表的な指標の 1 つとなっている。これまでに E-cadherin は転写調節での解析が多くなされ、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 シグナルによる Snail、SIP1 の活性化が明らかとなっており*[2]、β-catenin や LEF-1、Twist 転写因子による N-cadherin 発現誘導も EMT に関与していると考えられている。

本研究では、E-cadherin の発現低下から始まるシグナルネットワークの解明を目指しており、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し、さらに詳細にタイムコースを追って定量 PCR により確認するとともに、網羅的遺伝子発現解析も含めたアプローチを行なって、E-cadherin 発現抑制が起因となる EMT 誘導の可能性について検討を行なった。

2. 実験

2.1 使用した細胞

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擬する系として国内外で幅広く使われている。

2.2 PI ポリアミド

PI (ピロールイミダゾール) ポリアミドは、Derven, P. B らによりデュオカルマイシン A とディスタマイシン A という二つの抗生物質から同定された低分子有機化合物であり、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、塩基配列特異的に認識して結合すること、低分子であるためベクター無しに組織に取り込まれて核にデリバリーされること、核酸分解酵素で分解されることなく生体内で安定性があることにある。この特性を活用して、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。

Gene Expression Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition by the Repression of E-cadherin with Pyrrole Imidazole Polyamide

Yuta MIURA, Takuya YAMAZAKI and Chikako YOSHIDA-NORO

すでに E-cadherin 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 PI ポリアミドについて、E-cadherin 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]。

2.3 実験操作

HepG2 細胞播種時に培養液 (10%FBS 1%PS 添加 D-MEM) 中に、PI ポリアミドを種々の濃度で添加、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。

PI ポリアミドを用いた E-cadherin 発現抑制により誘導された EMT を評価するために、MTS Assay、Trypan Blue 色素排除試験、Invasion Assay、ArrayScan による定量解析(細胞毒性及び形態変化)、RT-PCR、Q-PCR による遺伝子発現解析を行なった。

3. 結果と考察

PI ポリアミドを HepG2 細胞に添加すると、配列依存的・濃度依存的に細胞に EMT 様の形態変化を引き起こした。

これまでの研究結果より、ArrayScan 細胞イメージアナライザーを用いた細胞骨格比較定量試験により、すでに知られている EMT に伴うアクチン細胞骨格の再構成が起こっていることが確認され、Invasion Assay により、この細胞形態変化が細胞浸潤を伴う EMT であることを確認した。一方、ArrayScan を用いた細胞生存試験及び MTS Assay、Trypan Blue 色素排除試験、細胞成長曲線等により、PI ポリアミドがアポトーシスを誘発せず、細胞に対する毒性もないことが明らかとなった。

EMT 誘導効果のある PI ポリアミドの添加により、E-cadherin 遺伝子発現が抑制されたのち、Snail、Slug の発現誘導が起こった。これにより、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。

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、Real-time 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。

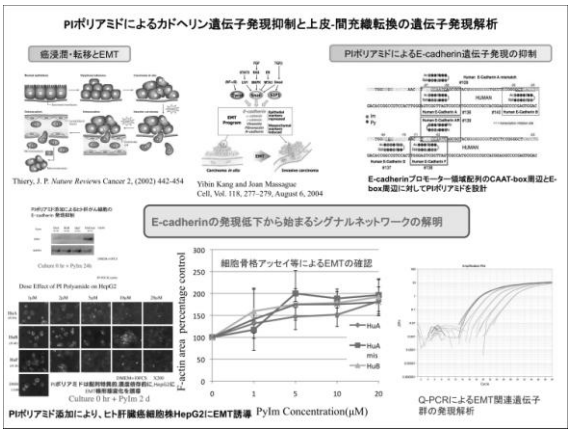

Fig.1 E-cadherin の発現低下による EMT の解明

参考文献

1) Thiery, J.P. *Nature Revie*ws Cancer 2, (2002) 442-454

2) Yibin Kang and Joan Massague *Cell*, Vol.118, 277–279 (2004)

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