

細胞接着分子カドヘリンと幹細胞の未分化性維持機構の研究

日大生産工(院) 佐野 由樹
日大生産工 野呂 知加子

1 まえがき

幹細胞とは自己複製能と分化能をもつ未分化細胞である。近年、この幹細胞の特性と分化制御機構の解明が、器官形成や個体発生における新規概念の提示や幹細胞から失われた組織を作り出す再生医療の実現につながることから、幹細胞研究のより一層の発展が期待されている。ヒト成体にも幹細胞は存在するが、我々はいわゆる万能細胞と言われるES細胞等に着眼して研究を行っている。これら万能細胞の特性である未分化性の維持には、細胞接着分子カドヘリンが重要である。カドヘリンとは、細胞表面に存在する膜貫通型の糖タンパク質であり、カルシウムイオン存在下で二量体を形成することにより、接着結合(Adherens junction)という細胞間接着構造を形成している体の形成と秩序維持に重要な役割をもつタンパク質である。

本研究では遺伝子発現制御部位に対して設計すると、転写因子・酵素の結合を阻害することにより、遺伝子発現を抑制することが知られている低分子有機化合物のPI(Pyrrrole-Imidazole)ポリアミドを用いて、幹細胞におけるカドヘリン遺伝子の機能を解析した。

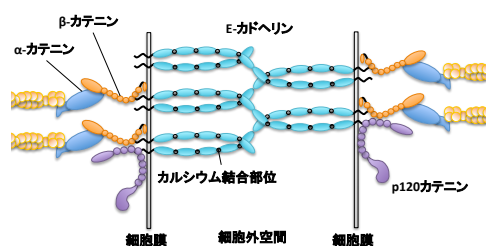


Fig.1 カドヘリンによる細胞接着構造図

2 実験方法および測定方法

カドヘリンプロモーター領域に対して6種のPIポリアミドを設計し合成精製した(CAAT 配列に対する A, CAAT 配列の一部を改変した A mismatch, E-box 配列に対する B, E-pal に対する C, CAAT 配列の一部を含んでいる部位に対する F, ネガティブコントロールとして G mismatch)。これらのPIポリアミド終濃度10μMとなるようにそれぞれ Dimethyl sulfoxide(DMSO)に溶かした。この溶液を全能性をもつマウスEC細胞 AT805細胞株(培養液: DMEM + 10% 牛胎児血清FBS + 1% 抗生物質PS)およびマウスES細胞(培養液: DMEM + ノックアウト血清代替KSR + 5% 牛胎児血清FCS + 1% ES細胞増殖因子LIF + 0.1% 2-メルカプトエタノール)の培養液中に添加した。またコントロールとして、培養液にDMSOのみを添加した細胞、培養液のみの細胞、これら計16種類の細胞を72時間培養及び細胞形態の観察を行った。また培養1日目から3日目の細胞からそれぞれRNAを抽出し、RT-PCR法および免疫組織学的方法により各細胞種におけるPIポリアミドの有無によるEカドヘリンの発現量の差や、幹細胞分化マーカーの発現の差を調べた。また、同じようにカドヘリンプロモーターに対して設計合成したPIポリアミドFをヒト肝臓がん細胞HepG2株培養中に添加し、間充組織様細胞にEMT転換した細胞をGeneChip解析した結果から特にポリアミド添加の有無による発現差が大きかった数種類の遺伝子について、RT-PCRによる発現確認を各細胞種について行った。

Study of Cell Adhesion Molecule Cadherin and Undifferentiation Mechanism of the Stem Cell

Yuki SANO, Chikako YOSHIDA-NORO

HepG2のEMTに伴って発現減少した主な遺伝子

CADM2	STRN3	CTNNB1
AMFR	MIER3	

HepG2のEMTに伴って発現増加した主な遺伝子

TIMP2	CLDN4	S100A6	S100A2
JUN	L1CAM	CTHRC1	CYR61
NES	CTGF	TGFβ1T1	

Fig.2 GeneChip 解析による HepG2 における遺伝子発現変化

3 実験結果および検討

カドヘリンプロモーター領域に対しPIポリアミドを添加し、72時間後の細胞形態変化の比較では、EC細胞AT805株に添加すると配列および濃度特異的に細胞が間充組織様細胞に転換、あるいは細胞間の間隙が広がる（細胞接着を緩める）効果が認められた。これらの現象はPIポリアミドによるカドヘリン遺伝子発現の低下と一部相関していた。ところが、PIポリアミドを胚性幹細胞ES細胞D3株あるいは分化能を失ったEC細胞F9株に添加した場合は、形態変化に変化が見られなかった。

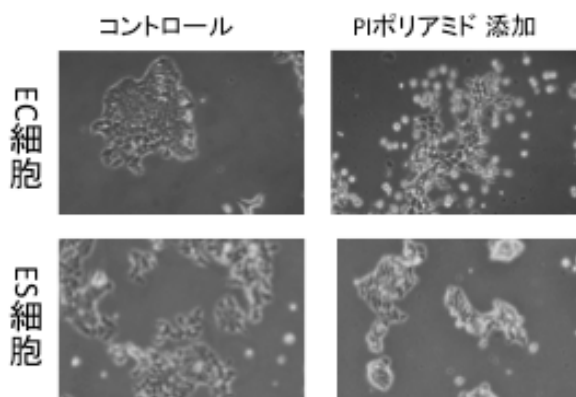


Fig. 4 PI ポリアミド添加(72 時間後)の各細胞形態

またこれらの細胞から抽出したRNAを用いてRT-PCR法および免疫組織学的方法による遺伝子発現群の解析を行った結果、各PIポリアミドを添加したES細胞そして細胞形態が変化したEC細胞でもControlとのカドヘリン遺伝子の変化がみられなかった。

またEMT 関連遺伝子であるSnailでも、同様にPIポリアミドを添加した細胞とコントロール細胞の発現量には変化がみられないという結果となった。

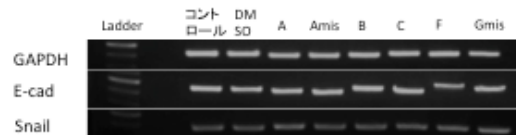


Fig. 5 PI ポリアミド添加による EC 細胞の遺伝子発現変化

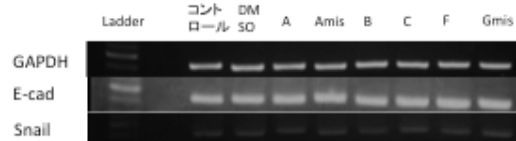


Fig. 6 PI ポリアミド添加による ES 細胞の遺伝子発現変化

また、同じようにカドヘリンプロモーター領域に対しPIポリアミドを添加したHepG2細胞の遺伝子発現変化をGeneChip解析した結果から、特にポリアミド添加の有無による発現差が大きかった数種類の遺伝子について、RT-PCRによる発現確認を各細胞種について行った。その結果、EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition)を誘導することが知られているTGFβetaによって発現誘導される遺伝子 Tgfb1i1 (Transforming growth factor beta 1 induced transcript 1)において、EC細胞で増加が確認された。PIポリアミド添加では形態の異なるES細胞については、再検討中である。

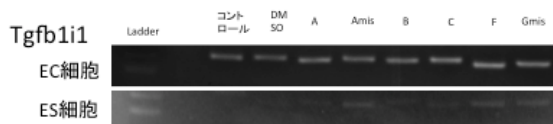


Fig. 7 PI ポリアミド添加による各細胞での Tgfb1i1 発現変化

「参考文献」

- 1) Yoshida C, Takeichi M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion : Identification of a cell surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. Cell 28, 217-224.
- 2) Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M. (1984) Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. Developmental Biology 1984 Jan; 101(1): 19-27.
- 3) Yoshida-Noro C, Takeichi M, Okada TS (1985) Detection of the initial step of mesenchymal differentiation of teratocarcinoma cells using the monoclonal antibody ECCD-1. Development Growth and Differentiation 27, 673-678.