

幹細胞のエピゲノム状態とPIポリアミドの効果に関する研究

日大生産工（院） ○福岡 正也

日大生産工 野呂 知加子

1, まえがき

幹細胞は自分と同じ能力を持つ細胞に分裂する能力(自己複製能)と皮膚や赤血球などの体細胞を作り出す能力(分化能)をもつ細胞である。この幹細胞が分化する際に上皮間充織転換（EMT:Epithelial Mesenchymal Transition）という変化をする。幹細胞は上皮細胞と間充織細胞の二つに変化しながら、位置や形態を変化させ、器官の形成や治療を行う。EMTには細胞接着分子カドヘリンが関連している¹⁾。この時Snail、Slug、Twistなどの転写因子がE-カドヘリンの発現を調節することでEMTが引き起こされると言われている。このEMTと細胞接着分子カドヘリンの係に着目し、カドヘリン遺伝子発現の低下が引き金となり、Snail、Slug、Twistなどが発現し、その結果EMTが起こるという従来説とは異なる経路の可能性を調べることを目的とする。

2, 提案手法

今研究において用いる試薬はPIポリアミドである。PIポリアミドとは、N-メチルピロール単位(Py)、N-メチルイミダゾール単位(Im)及びγ-アミノ酪酸単位を含む低分子有機化合物である。DNAのC-G塩基対に対してはPy/Im対が、G-C塩基対に対してはIm/Py対が、A-T塩基対及びT-A塩基対に対してはPy/Py対がそれぞれDNAと結合する。そのため、PIポリアミドの構造を設計し、プロモーターに結合させれば、転写を阻害すればその配列から生み出される物質を抑制することができる。この特性を用いて、カドヘリン遺伝子発現の低下を先に起こすことができる²⁾。

これらの事実から、幹細胞であるES細胞(胚性幹細胞)、EC細胞(胚性腫瘍細胞)を用いて、この二つの細胞にカドヘリンを抑制するように設計したPIポリアミドを導入し、3日間の細胞の状態の比較を行った

ところEC細胞はEMTを引き起こしたが、ES細胞は逆に結合が強くなった。これは、ES細胞が胚盤胞の内部細胞塊由来であり、EC細胞が卵筒胚の胚盤葉上層由来であるため、二つの細胞はメチル化状態が異なることが原因であると考えられる。そのため、ジーンチップによりES細胞とEC細胞で発現の異なる遺伝子の中から細胞接着に関連する遺伝子を抽出した結果、カドヘリンファミリーの発現に差異が大きくみられることがわかった。

3, 実験方法及び測定方法

37℃のインキュベーターにより細胞を培養し、一定量増えたタイミングでトリプシンにより細胞を6cm dishからはがし、セルカウントにより細胞数を測定した。この細胞数から培地 3mL あたり細胞数が 1.0×10^5 個の細胞が含まれるよう計算し、濃度が $10 \mu\text{g/mL}$ のMouse PIポリアミドFが含まれた培地に添加した。ピペッティングを行い、6cm dishに細胞を含んだ培地を3mL添加し、インキュベーター内に24時間置いた。24時間後培地を吸引除去し、HBSSで6cm dishを洗浄後、スクレーパーにより細胞をはがし、1.5mLチューブに移した。この細胞からDNAをDNeasy Blood & Tissue Kitを用い、DNAの抽出を行った。そして、そのDNAに対してEZ DNA Methylation kitを用い、バイサルファイト処理を行い、DNAのシトシンをウラシルに変換した。PCRによりDNAを増幅させ、より増幅を進めるためにPCR産物をベクターにLigationし、形質転換により大腸菌にプラスミドを導入した。インキュベーター内に24時間静置し、コロニーを形成させたのち液体培地により大腸菌を増幅させた。液体培地からプラスミドを精製し、外部機関により解析を委託した。

Study on the epigenomic state of stem cells and the effect of PI polyamide
Masaya FUKUOKA and Chikako Y NORO

4, 結果および考察

Gene Chip の結果を解析した結果以下の表のようにカドヘリン遺伝子の発現の差異が現れた

表 2, EC 細胞とコントロールとの比較

遺伝子名	Scales ignal (con)	発現の有無 (con)	Scales ignal (F)	発現の有無 (F)
Cadm2	15.38075	P	3.57443	A

表 3, ES 細胞とコントロールの比較

遺伝子名	Scales ignal (con)	発現の有無 (con)	Scales ignal (F)	発現の有無 (F)
Cdhr1	42.95726	A	307.7434	P
Cdh3	20.71424	A	53.86008	P

表 4, PI ポリアミド導入時の ES と EC の比較

遺伝子名	Scales ignal (EC)	発現の有無 (EC)	Scales ignal (ES)	発現の有無 (ES)
Cdh6	602.2245	P	3.251855	A
Cdh10	315.2775	P	16.23325	A
Pcdh α 1	382.4157	P	25.32989	A
Cdh13	254.2315	P	33.13084	A

この結果カドヘリンファミリーの遺伝子発現に差異があることがわかった。特に Cadm2 は EMT における細胞遊走の調整に大きく関連していると考えられている³⁾。

また、実際に ES 細胞から DNA を抽出した結果図 1 のようなバンドが確認でき、このバンドは DNA のバンドであると確認できた。この結果は ES 細胞から DNA が抽出可能であり、これらに対してバイサルファイトシーケンシングを行うことでメチル化状態を確認できると考察できた。

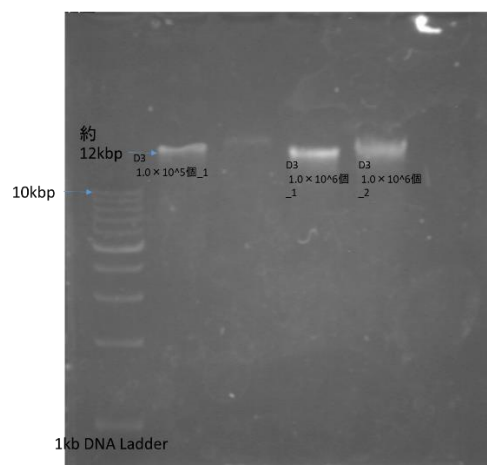


Fig1, ES 細胞の DNA 抽出結果

5, まとめ

EC 細胞と ES 細胞では発現が大きく異なり、EMT にも大きく関わっていることがわかった。その為、DNA のメチル化状態を確認し、発現の差異について詳細に把握する必要がある。

「参考文献」

- 1) L Larue, M Ohsugi, J Hirchenhain, and R Kemler., “E-cadherin null mutant embryos fail to form at trophoctoderm epithelium” Proc Natl Acad Sci U S A, 91 巻, 17 号, (1994), p8263–8267
- 2) Saito K, Fukuda N, Shinohara K, Masuhiro Y, Hanazawa S, Matsuda H, Fujiwara K, Ueno T, Soma M., “Modulation of the EMT/MET process by pyrrole-imidazole polyamide targeting human transforming growth factor-β1” The International Journal of Biochemistry & Cell Biology ., 66 巻, (2015), p112–120
- 3) Dongliang Li, Yongjian Zhang, He Zhang, Chao Zhan, Xin Li, Tu Ba, Zini Qiu, Fang E, Guixiang Lv, Chendan Zou, Chuxuan Wang, Lining Si, Chaoxia Zou, Qiang Li, corand Xu Gao., “CADM2, as a new target of miR-10b, promotes tumor metastasis through FAK/AKT pathway in hepatocellular carcinoma ” J Exp Clin Cancer Res, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology , 66 巻, (2015), p112–120