

論文要旨

MDCK 細胞で Snail を発現させても 上皮間葉転換を誘導しない

氏 名 伊 澤 彦 哉

【序論及び目的】

上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) は組織リモデリング、器官形成、創傷治癒に加え、癌の進行に決定的な役割を果たす。EMT の結果、上皮細胞は極性を失い、間葉系細胞の特徴を獲得し、腫瘍細胞の浸潤能と遊走能は亢進する。E-cadherin は接着結合の構成要素で、上皮形態の形成と維持に関与している。desmoglein はデスモソームの構成要素で、デスモソームを有している上皮細胞で発現している。E-cadherin と desmoglein はカドヘリンファミリーのメンバーである。EMT の特質は E-cadherin の発現の低下である。これまでの研究の結果、Snail, Slug, Twist, ZEB1 といった幾つかの転写因子が E-cadherin の転写を抑制し、EMT を誘導する事が明らかになっている。事実、我々の研究室では、イヌ腎上皮細胞 (MDCK)、ヒト皮膚由来上皮細胞 (A431)、その他の細胞で Snail を発現させると EMT が誘導されることを観察して来た。Snail は E-cadherin プロモーター内の E-box と呼ばれる配列 (5'-CACCTG-3') に結合することで、E-cadherin の転写を抑制する。すなわち、プロモーターに結合した Snail は、histone deacetylase (HDAC) をリクルートしてクロマチンを凝縮した構造に変える。さらに、Transforming growth factor- β の下流では、DNA methyltransferase もリクルートしてプロモーター領域の DNA メチル化を誘導し、エピジェネティックな変化を引き起こすことが報告されている。しかし、複雑な EMT の過程を惹起する分子機構の全体像はよくわかっていない。

学位申請者は MDCK 細胞に似ているとされるウシ腎臓由来上皮細胞 (MDBK) に Snail の発現ベクターを導入して安定発現細胞株を得た。予想に反して、Snail 発現 MDBK 細胞は EMT 様の変化を全く示さなかった。そこで本研究は、MDBK 細胞において Snail 発現により誘導された変化を明らかにすることにより、何故 EMT が誘導されないのかを明らかにするための第一歩とすることを目的とした。

【材料及び方法】

【細胞と遺伝子導入】MDBK 細胞はダルベッコ変法イーグル培地に 10% の血清を加えて培養した。HA をタグ付けした Snail と neomycin 耐性遺伝子を組み込んだ pCAGGS ベクターの導入は、リン酸カルシウム法により行った。

【解析】1) タンパク発現量はウエスタンブロッティング、2) タンパクの局在は免疫染色、3) 細胞接着活性をアグリゲーションアッセイ、4) mRNA 量を RT-PCR により解析した。5) E-cadherin プロモーターのメチル解析は、以下のように行った。QIAGEN 社のキットを用いてゲノム DNA をバイサルファイト処理し、PCR により目的部位を増幅してから Promega 社の pGEM-T にクローニングした。JM109 大腸菌に形質転換して増えたプラスミドを精製後、塩基配列の決定を行い、メチル化部位と非メチル化部位を確認した。

【結 果】

- ① Snail を発現させても MDBK 細胞は上皮細胞の特徴（細胞の形態、E-cadherin を含む上皮マーカーの発現維持、N-cadherin を含む間葉系細胞マーカーの発現上昇の欠如、その他）を示した。
- ② したがって、Snail は MDBK 細胞では EMT を誘導できなかった。
- ③ MDBK 細胞における Snail の発現は E-cadherin プロモーターの DNA メチル化を誘導しなかった。
- ④ MDBK 細胞における Snail の発現は他の EMT を誘導する転写因子の発現上昇を誘導しなかった。

【結論及び考察】

ウシ腎臓由来の MDBK 細胞を用いて Snail 発現安定株を作製した。Snail を導入した MDBK 細胞は上皮細胞の形態のままで、コントロール細胞と比較して細胞間接着の減少を示さなかった。これに一致して、上皮マーカーである E-cadherin と Desmoglein の発現減少や間葉系マーカーである N-cadherin や fibronectin の発現上昇は検出できなかった。これらのことから、MDBK 細胞において Snail は EMT の誘導をできないことが判明した。さらに、E-cadherin プロモーターはメチル化されていなかった。また、Snail を MDCK 細胞で発現させると、Slug や ZEB1 のような他の EMT 誘導転写因子の発現を増加させるが、Snail-MDBK 細胞ではこれらの転写因子の発現量増加は認められなかった。したがって、MDBK 細胞において、Snail が EMT を誘導できないのは、他の EMT 誘導因子の発現を増加させることができないことによる可能性がある。