

# エピジェネティクスに着目した胃がん転移阻害法の創出

同志社大学 生命医科学部 遺伝情報学研究室  
谷口 浩章

## 序論

1985年以降、日本の死因のトップは悪性腫瘍となっている。遺伝子変異などによって形成された原発腫瘍が正常の組織の機能に及ぼす影響は、多くの場合膨張する腫瘍塊によってかけられる物理的圧力、または原発腫瘍塊の細胞が近接している正常組織を浸潤し、それにより生体の機能を障害することによる。このような原発腫瘍は危険で浸食的ではあるが、早期診断学、分子標的治療薬、外科手術の進歩による治療レベルの向上で、癌による死亡の原因の約10%となっている。患者の残りの90%は、原発腫瘍から遥かに離れた部位でみつかるといわれる癌病変、いわゆる転移によって亡くなっている。従って、癌転移メカニズムの解明は極めて重要な研究分野である<sup>1)</sup>。

癌細胞がこのような転移能を獲得するプロセスには、上皮間葉移行(Epithelial mesenchymal transition、以下EMT)が深く関与することが知られている<sup>2,3)</sup>。EMTとは、上皮細胞が上皮としての形質を失い、線維芽細胞のような間葉系細胞に形態変化し、運動性と浸潤性を獲得する現象で、通常初期胚発生や創傷治癒において重要な役割を果たすことが知られている。EMTが起こると上皮細胞におけるE-cadherinや $\beta$ -カテニンなどの上皮細胞のマーカーの発現が消失し、N-cadherinやFibronectinなどの間葉系マーカーが出現する。しかし進行した癌細胞でもEMTが認められることが明らかにされつつある。浸潤性と運動性を獲得した癌細胞は血管やリンパ管に浸潤し、体中に転移巣を形成する。EMTを誘導する環境因子としてTGF- $\beta$ やTNF- $\alpha$ 、タンパク質分解酵素MMPなどが知られており、細胞内シグナルとしてはNotchシグナルやBMPシグナルの関与が指摘されている。E-cadherinの発現を調整している転写因子としてはSnail、Slug、Twistなどが知られている。TGF- $\beta$ はセリンスレオニンキナーゼ型受容体に結合し、Smadと呼ばれるタンパク質を介し、細胞内にシグナルを伝達することが知られている。TGF- $\beta$ と結合したI型受容体によって活性化された特異型Smad(R-smad)は、共有型Smad(Co-Smad)と複合体を形成する。このSmad複合体が核内へ移行し、種々の転写因子や転写共役因子と結合することによって、SnailやSlugなどのEMT関連遺伝子の転写を調節することが明らかにされている<sup>4)</sup>。しかしながら、Smadを介さないシグナル伝達経路によるEMT誘導機構の存在<sup>5)</sup>やEMTがmiRNAによる調節を受けているという報告も近年されている<sup>6)</sup>。

近年の研究で単にシグナル伝達がEMTを調節しているという訳ではなく、クロマチンリモデリング、所謂Epigeneticな変化を伴いEMTが誘導されていることが示唆されている<sup>6)</sup>。しかし、その詳細は未だ明らかにされていない。初期胚発生や創傷治癒という特殊な場面でしか起こらないEMTが癌細胞でも起き、上皮系細胞から間葉系細胞へ癌細胞自身の運命転換が行われるということは、遺伝子変異によってEMTが引き起こされたのではなく、遺伝子変異を伴わないEpigeneticなメカニズムを介しEMTが誘導されたということが考えられる。よって本研究では細胞培養系を用いたEMT誘導モデルを作成するとともに、誘導されたEMTにおいてEpigeneticな制御が関与するかどうかを検討した。

また、最近になって一般的なプラスチックシャーレ上での細胞の振る舞いと生体内での細胞の振る舞いが著しく異なるという報告がされている<sup>7,8)</sup>。非常に興味深いことに、細胞分化の過程で力学的環境要因が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある<sup>9,10)</sup>。生体内の部位にもよるが、細胞は通常0.1kPaから100kPaほどの硬さの間で生存しており、一般的なdishの硬さは $1 \times 10^7$ kPaほどの硬さといわれている。TGF- $\beta$ を添加するだけで、細胞の形態が通常時と全く異なるものになるEMTという現象において、足場の硬さを変えることでEMTを誘導した細胞にどのような影響がでるのか興味を持ち、生体内の硬さに近いハイドロゲルがコーティングされたSoftwell(Matrigel社)を用いて力学的環境因子が細胞へ及ぼす影響を解析した。

## 2.実験方法

### 2-1 細胞培養

NMuMG細胞(マウス乳腺上皮由来)、MKN7細胞(ヒト胃癌細胞株、高分化型管状腺癌由来)、MKN45細胞(ヒト胃癌細胞株、低分化型充実型腺癌由来)、MCF10A細胞(ヒト不死化乳腺上皮細胞由来)はCO<sub>2</sub>濃度5%、37°Cの環境下で培養した。

## 2-2 RNA の単離

ISOGEN II (ニッポンジーン)もしくは RNeasy Mini (Qiagen)を用いて RNA を抽出するとともに、M-MLV RTase (Invitrogen) により cDNA を合成した。その後、Thermal Cycler Dice RealTime System II (タカラバイオ株式会社)を用いて目的遺伝子の mRNA 発現量を測定した。Normalization Control には GAPDH、18S rRNA の値を用いた。

## 2-3 Softwell を用いた EMT 誘導系

II型コラーゲン(BD biosciences)を 10 $\mu$ g/ml となるよう PBS で希釈し Softwell に 0.5ml ずつ加え、室温で 15 分間インキュベートした。余分なコラーゲンを除去し、NMuMG 細胞を 0.5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml となるように撒いた。16 時間後、TGF- $\beta$ 1を終濃度3ng/ml となるように加え、24 時間後 RNeasy (QIAGEN)で細胞を回収した。

## 3. 結果

### 3-1 EMT 誘導系の確立

EMT 誘導系を確立するために、前日に 6well plate に 4.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well(Serum Free Medium)、7.0 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well (10%FBS Medium) で撒いておいた NMuMG 細胞に TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems) を終濃度 3ng/ml となるように加え<sup>12)</sup>、添加から 1 日後に形態観察、Total RNA 抽出を行なった。TGF- $\beta$ 1を添加した細胞では、Control の細胞と比べて、線維芽細胞様に形態が変化することを確認した。上皮系マーカーである E-cadherin と間葉系マーカーである Vimentin、EMT を引き起こす転写因子として知られる Snail、Twist、Slug のプライマーを用いて Real-Time PCR を行なった。E-cadherin の発現低下と Vimentin、Snail、Twist、Slug の発現上昇が認められることから、TGF- $\beta$ 1により EMT が誘導され、上皮細胞である NMuMG 細胞が間葉系細胞に形態変化したと示唆される。

### 3-2 ヒストン化学修飾酵素阻害剤による EMT の抑制

近年の研究で EMT が Epigenetic なリプログラミングによって制御されているということが示唆されており<sup>12)</sup>、ヒストン化学修飾酵素阻害剤を加えることで EMT が抑制されるのではないかと考え、以下の実験を行なった。前日に 6well plate に細胞を撒き、1 日後 Serum Free の Medium に交換し、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC 阻害剤である NCH-51 と Trichostatin A (FCS、以下 TSA) 、ヒストンリジン脱メチル化酵素 LSD1 阻害剤である NCL-1 と NCD-25、同じくヒストンリジン脱メチル化酵素 JMJD2 阻害剤である NCDM-32b をそれぞれ添加して前処理を行なった後<sup>13)</sup>、TGF- $\beta$ 1を終濃度 3ng/ml となるよう加え、形態を観察した。条件検討の結果、NCH-51 を 1 $\mu$ M、NCL-1 を 20 $\mu$ M、NCD-25 を 5 $\mu$ M、NCDM-32b を 10 $\mu$ M、TSA を 100nM となるよう加えることとした。また、NCH-51 と NCL-1、NCD-25 と NCDM-32b は TGF- $\beta$ 1を添加して 3 日後、TSA は TGF- $\beta$ 1を添加してから 1 日後に写真を撮り、細胞を回収した。NCH-51 と NCL-1、NCDM-32b で前処理した細胞は、線維芽細胞様の形態を獲得し、完全に EMT が起こってしまっていたが、NCD-25 と TSA 処理では EMT が抑制されているように見られた。また、NCD-25 と TSA の効果を 10%FBS 条件でも検討してみた。上記と同様に細胞を撒き、翌日新しい 10%FBS 入りの Medium に交換した。TGF- $\beta$ 1を添加してから 1 日後、形態観察を行なったところ、TSA 処理では Serum Free 条件の時と同様に、EMT 誘導が抑制されているようであったが、NCD-25 処理では TGF- $\beta$ 1による EMT の誘導を抑制出来なかった。以上の形態観察から、TSA が TGF- $\beta$ 1による EMT を抑制しているという仮説を立て、TSA で前処理した細胞に TGF- $\beta$ 1を添加した後、EMT 関連遺伝子の mRNA 発現量を Real-Time PCR で確認することとした。TSA 処理した細胞で E-cadherin の発現量低下の抑制が認められたが、Snail の発現量は上昇していた。また、NMuMG 細胞において TGF- $\beta$ 1による EMT 誘導が Prdm16 の存在下においては認められないことが明らかになるとともに、E-cadherin の減少も認められなくなっていた。Prdm16 がエピジェネティックなメカニズムを介して TGF- $\beta$ 1の作用を抑制するののかについては今後さらなる検討が必要である。

### 3-3 MKN7、MKN45、MCF10A で TGF- $\beta$ 1による EMT は誘導されない

マウス由来乳腺上皮細胞である NMuMG 細胞以外にも、MKN7、MKN45、MCF10A といったヒト由来の細胞に TGF- $\beta$ 1を添加しても EMT が誘導されるのかどうか実験を行った。前日にこれらの細胞を 6well plate に撒き、翌日 Serum Free の Medium に交換した後、TGF- $\beta$ 1を終濃度10ng/ml となるよう加え、6 日後に形態観察と細胞の回収を行なった。MKN7、MKN45、MCF10A 細胞、共に目立った形態変化は確認されなかった。前述と同様に Real-Time PCR で EMT 関連遺伝子の発現量を調べてみると、MKN7 細胞では E-cadherin の発現低下は認められなかったが、Snail と Twist の発現量が 2 倍に増えていた。MKN45、MCF10A 細胞で E-cadherin の減少、Snail、Twist の増加は見られたが、

NMuMG 細胞と比べて極めて微妙な差であった。

3-4 力学的環境要因によって細胞の形態・遺伝子量に変化が生ずる。

EMT 誘導細胞への力学的環境因子による影響について解析を行なった。それぞれのウェルに 0.2 kPa から 50kPa の硬さのハイドロゲルがコーティングされた Softwell を使用した。II 型コラーゲン 10 $\mu$ g/ml をウェルに加えコーティング処理を行なった後、Softwell に NMuMG 細胞を撒き、半日後 TGF- $\beta$ 1 を終濃度 3ng/ml となるよう添加した。1 日後、形態観察を行ったところ、4kPa から 12kPa という硬さのウェルにおいて、TGF- $\beta$ 1 を添加し EMT を誘導させた細胞が dish から剥がれ、細胞塊を形成するという現象がみられた。4kPa 未満のウェルでは TGF- $\beta$ 1 を添加していないウェルでも細胞が張り付いておらず、12kPa 以上のウェルでは、通常の dish と同様に線維芽細胞様に形態が変化していた。浮いている細胞塊と張り付いている細胞全てを QIAGEN の RNeasy で回収し Total RNA 抽出を行なった。この Total RNA を用いて cDNA 合成をし、Real-Time PCR を行なったところ、4kPa から 12kPa という硬さのウェルの TGF- $\beta$ 1 添加により浮いている細胞でも、通常の硬さのウェルで EMT が誘導されている細胞と同様に、E-cadherin が減少していることが確認出来た。また EMT マーカー遺伝子発現量にも変化がみられ、通常の硬さのウェルで TGF- $\beta$ 1 を添加した細胞の Snail、Slug、Twist よりも、8kPa から 12kPa のウェルで TGF- $\beta$ 1 を添加した細胞の方が、発現量が高かった。近年、TGF- $\beta$ 1 添加時にヒストンリジン脱メチル化酵素 LSD1 がクロマチンの構造変化を誘導し、EMT 関連遺伝子の発現を調節しているという報告がされている<sup>14)</sup>。場の硬さの違いに影響を受けた Epigenetic Factor が、この Snail と Slug の発現量の差を引き起こしているのではないかと考え、HDAC1、HDAC2、LSD1 の mRNA 発現を調べたところ、通常の硬さのウェルで処理した細胞と比べて、8kPa から 12kPa のウェルで処理した細胞の方が、LSD1 の mRNA 発現量が約 2 倍に増加しているという結果が得られた。

#### 4. 考察

NMuMG 細胞の線維芽細胞様な形質獲得、E-cadherin の発現低下と、Snail や Twist の発現上昇という EMT 関連マーカー遺伝子の変化から、NMuMG 細胞を用いた TGF- $\beta$ 1 添加による EMT 誘導系を確立した。しかしながら MKN 細胞株や MCF10A 細胞を用いた実験で EMT が誘導されなかったことから、EMT は細胞によって誘導のされやすさが異なり、MKN 細胞株という元々 E-cadherin の発現量の低い細胞<sup>15)</sup>では、TGF- $\beta$ 1 のみの刺激だけでは EMT が起こりにくいという現象を見出した。MCF10A 細胞では EMT 様の遺伝子変化が少なからず起きているが、形態に変化が見られないことから、形態変化を防ぐ因子が発現されている可能性が考えられる。また NMuMG 細胞は MKN 細胞株や MCF10A 細胞に比べて、10% FBS の培地を無血清培地に交換しただけで細胞の形態に変化が起きることや、ヒストン修飾酵素阻害剤を少量添加するだけで細胞が死んでしまうことなどから、細胞自体の外的刺激に対する感受性が高い可能性が考えられる。この細胞依存的な EMT 誘導効率に関しては今後検討が必要である。

TGF- $\beta$ 1 がレセプターに結合すると、Snail の発現が亢進し、その Snail が E-cadherin のプロモーターに結合することで E-cadherin の発現を抑制するということが知られている<sup>16)</sup>。TSA で細胞を前処理し TGF- $\beta$ 1 添加することで E-cadherin の発現低下作用が抑制されるが、Snail の発現量は上昇してしまっていた。このことから、TSA はリプレッサーである Snail に結合している HDAC の作用を特異的に阻害することで、E-cadherin のプロモーター活性を上昇させ、E-cadherin の発現低下作用を抑制していると考えられる。この仮説により Snail の発現が上昇している理由に説明がつく。または、miRNA といった Snail を介さない因子や、TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達系における SMAD を介さない Ras/MAPK などの経路内の因子、もしくは未知の因子による E-cadherin の発現調節に HDAC が関与する可能性が示された。このことから TGF- $\beta$ 1 によって誘導された EMT が Epigenetic な調節を受けていることが示唆された。TSA と同じ HDAC 阻害剤である NCH-51 が EMT 誘導を阻害しなかった理由としては次の事が考えられる。ヒドロキサム酸である TSA は、TSA 自身が直接 HDAC の活性中心に結合して、HDAC の機能を抑制すると考えられているが、一方 NCH-51 は細胞内で加水分解されチオールを生成し、そのチオールが HDAC の酵素活性中心である亜鉛イオンに結合し HDAC 阻害剤としての作用を示すとされている<sup>17,18,19)</sup>。このように TSA と NCH-51 では活性中心に結合する分子が異なっており、細胞種や培養条件によって結合効率に違いが現れるのかもしれない。他のヒストン化学修飾酵素阻害剤の NCH-51(HDAC 阻害剤)、NCL-1 と NCD-25(LSD1 阻害剤)、NCDM-32b(JMJD2 阻害剤)で EMT 誘導が阻害されなかった理由についても上記と同様の分子構造の違いによるものとも考えられ、この点に関しては、LSD1 および JMJD2 に対する異なる種類の阻害剤を試すなど、今後検討が必要である。

## 5.引用文献

1. Robert A. Weinberg The biology of CANCER (Graland Science, Taylor & Francis Group,LLC 2006)
2. Nieto MA. (2011) *Annu Rev Cell Dev Biol.***27**:347-76.
3. Thiery JP. (2002) *Nat Rev Cancer.* **6**:442-54.
4. Guo X, Wang XF. (2009) *Cell Res.***19**:71-88.
5. Thiery JP, Huang R. (2005) *Dev Cell.* **8**:456-8.
6. Wu CY. et al. (2012) *TrendsGenet.***28**:454-463.
7. Bissell MJ.et al. (2003) *CurrOpin Cell Biol.* **15**:753-62.
8. O'Brien LE. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**:531-7
9. Even-Ram S. et al. (2006) *Cell.* **126**:645-7.
10. Engler AJ. et al. (2006) *Cell.***126**:677-89.
11. Guan F. et al. (2006) *ProcNatlAcadSci U SA.***106**:7461-7466.
12. Tiwari N. et al. (2012) *Semin Cancer Biol.***22**:194-207.
13. Yoshikawa M. et al. (2007) *J Am SocNephrol.***18**:58-65
14. McDonald OG.et al. (2011) *Nat StructMol Biol.***18**:867-74.
15. Liu AN. et al. (2012)*Mol Cell Biochem.***367**:195-203.
16. Battle E. et al. (2000) *Nat Cell Biol.***2**:84-9.
17. Gallinari P. et al. (2007) *Cell Res.* **17**:195-211.
18. Pan LN. et al. (2007) *Cell Mollmmunol.* **4**:337-43
19. Suzuki T. et al. (2005) *J Med Chem.***48**:1019-32.