

令和元年9月11日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07304

研究課題名(和文)腫瘍関連抗原 EpCAMは重層扁平上皮のタイト結合の形成・機能を制御するか？

研究課題名(英文) Does a tumor-associated antigen, EpCAM, regulate formation and function of tight junction in stratified squamous epithelium?

研究代表者

瀬尾 皓 (SEO, AKIRA)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：70804037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌で高発現EpCAMは細胞接着や細胞増殖、腫瘍の進行に関与する膜貫通糖タンパク質で、正常組織である重層扁平上皮でも発現がみられる。EpCAM遺伝子を破壊したケラチノサイトを作成し、三次元培養系を使って、重層扁平上皮形成過程におけるタイト結合形成と細胞間透過性の変化を調べることを目的とした。マウスケラチノサイト株を三次元培養法で培養して口腔粘膜上皮様の非角化重層扁平上皮を形成できた。タイト結合膜蛋白claudin 1, 4, 6, 7の発現をウエスタンブロットと蛍光免疫染色で調べて、生体とほぼ同様であることを確認した。しかし、EpCAM遺伝子が破壊された細胞は得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、線維芽細胞を使わずケラチノサイト単独で重層扁平上皮を構築する三次元培養系を用いることで、線維芽細胞からの間接的な影響(成長因子などの分泌蛋白)を排除して、上皮単独で解析できる点で意義がある。また、目的とする遺伝子産物をマウスで破壊して解析する場合、一般的には多大な労力と費用がかかる。さらに、機能的・形態的に明瞭な変化がなかったり、胎生致死であるためにその後の解析が困難な場合があり得る。本研究では、ケラチノサイトで働く遺伝子の機能を解析するためのひとつのスクリーニング系として活用できる点で意義がある。

研究成果の概要(英文)：In cancer, highly expressed EpCAM is a transmembrane glycoprotein involved in cell adhesion, cell proliferation, and tumor progression, and expression is also observed in stratified squamous epithelium, which is a normal tissue. We aimed to create keratinocytes from which the EpCAM gene has been disrupted and to investigate changes in tight junction formation and intercellular permeability during stratified squamous epithelium formation using a three-dimensional culture system. In this study, a three-dimensional culture method using the mouse keratinocyte strain (K38) formed a non-keratinized stratified squamous epithelium like the oral mucosa epithelium. The expression of the tight junction membrane protein claudin (CL) 1, 4, 6, 7 was examined by Western blot and fluorescent immunostaining to confirm that it was almost similar to that of the living body. However, cells in which the EpCAM gene was disrupted could not be obtained.

研究分野：細胞生物

キーワード：タイト結合 EpCAM ケラチノサイト 細胞間透過性

1. 研究開始当初の背景

Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM; 別名 Tacstd1, Trop1, CD326)は、約 40 kDa の I 型膜貫通糖蛋白で腫瘍関連抗原として初めて同定された(Herlyn et al, 1979)。しかし、EpCAM は正常の皮膚ケラチノサイトの細胞膜でも発現し(Klein et al, 1987)、創傷治癒過程や悪性形質転換時に発現が亢進する(Trzpis et al, 2007, 2008; Cirulli et al, 1998; deBoer et al, 1999; Breuhahn et al, 2006; Gires et al, 2009)。また、EpCAM はタイト結合膜蛋白 claudin-7 と結合することが知られている(Ladwein et al, 2005)。EpCAM 欠損マウスは、小腸において claudin-2, -3, -7, -15 の発現が減少し、同時に腸上皮(単層扁平上皮)のバリア機能不全により生後間もなく死亡する(Zili et al, 2012)が、重層扁平上皮(皮膚、口腔、食道など)における変化についての報告はない。ゼブラフィッシュにおいては、EpCAM 遺伝子破壊で上皮の形態形成に影響があるという報告(Slanchez et al, 2009)がある。

ケラチノサイトの三次元培養系は、重層化、層分化、角化、創傷治癒、癌浸潤などを研究する上でたいへん有用である。皮膚モデルとしては、線維芽細胞を含むコラーゲンゲル(真皮のアナログ)の上にケラチノサイトを播種し、気液界面培養(airlift)により 2-3 週間程度培養して角化重層扁平上皮を形成させる方法が一般的である。皮膚は、上皮と真皮の相互作用の上に成り立っており、この三次元培養系は皮膚モデルとして合理的といえる。一方で、ある刺激や操作による上皮の変化が、上皮に直接効いているのか、あるいは、線維芽細胞を介して間接的に効いているのかがわかりにくいという欠点がある。我々は、線維芽細胞を含むコラーゲンゲルを使わずに、初代培養ヒトケラチノサイトをセルカルチャーインサートのフィルター上に直接播種し、皮膚の角化重層扁平上皮に類似した重層構造物を形成する培養系を確立した(Seo et al, 2016)。

2. 研究の目的

非角化重層扁平上皮のタイト結合は表層のケラチノサイト間に形成され、細胞間透過性を制御している。しかし、タイト結合形成膜蛋白 claudin-1, -4, -7 は、タイト結合形成前の下層のケラチノサイトの細胞膜全周にすでに発現し、その意義は現在まで不明である。腫瘍関連抗原として 1979 年に同定された EpCAM は、正常ケラチノサイトの細胞膜全周に発現し、claudin-7 と結合する。claudin-7 が「タイト結合領域」か「それ以外の細胞膜領域」のどちらに局在するかを EpCAM が制御することで、タイト結合の形成、細胞間透過性が制御されているのではないかと我々は考えている。そこで、本研究では Crispr/Cas9 システムで EpCAM 遺伝子を破壊したケラチノサイト(マウスの表皮由来のマウスケラチノサイト細胞株 K38)を作成し、これを我々が確立した三次元培養系で培養して解析する。今回使用する三次元培養系は、研究開始当初の背景で述べたとおり、細胞をセルカルチャーインサートの膜上に直接播種し、線維芽細胞を使わず、ケラチノサイト単独で非角化重層扁平上皮様構造を形成できる。この三次元培養系を使って、ケラチノサイトの重層化の過程でのタイト結合形成、細胞間透過性に対する影響を解析し、ケラチノサイトにおける EpCAM の機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ケラチノサイトでのタイト結合の形成と細胞間透過性に対する EpCAM の機能を明らかにするために、Crispr/Cas9 システムにより EpCAM 遺伝子を破壊したケラチノサイトを作成し、申請者らが確立した三次元培養系を使って、重層化の過程におけるタイト結合形成と細胞間透過性の変化を調べる。微細形態の解析に光学および透過型電子顕微鏡、タイト結合膜蛋白の局在解析に蛍光免疫染色、細胞間透過性の解析に Sulfo-NHS-Biotin および細胞間電気抵抗を使う。さらに、ドキシサイクリンで発現誘導が可能な pTet-One ベクターに EpCAM 遺伝子を組み込んで、EpCAM 遺伝子破壊ケラチノサイトに導入してリカバリー実験を行う。これにより、Crispr/Cas9 システムによる EpCAM 遺伝子破壊操作が目的遺伝子特異的にできているかどうかを確認して、ケラチノサイトにおける EpCAM の機能を明らかにする。

EpCAM CRISPR/CAS9 KO plasmid (m) (Santa Cruz 社, sc-421499)を、UltraCruz Transfection Reagent (Santa Cruz 社, sc-395739)を使って、マウスケラチノサイト K38 に導入して、EpCAM 遺伝子を破壊する。KO plasmid を導入後に、細胞を 10 cm dish に 20 個、50 個、100 個、200 個、500 個で播種し、single colony を 30 個程度拾う。これらを EpCAM 抗体による免疫染色と、Western blotting により EpCAM 蛋白の発現の消失を確認して、最低 3 つ以上のクローンを取得する。

この方法で遺伝子導入がうまくいかない場合は、本学の先端科学研究センターに設置されているネッパジーン社のエレクトロポレーター(NEP21)を使ってエレクトロポレーションにより遺伝子破壊細胞を得る。

4. 研究成果

研究実績の概要

EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) は細胞接着や細胞増殖、腫瘍の進行に関与する膜貫通糖タンパク質で、癌で高発現するため、癌の診断および予後のマーカーとして使われているが、正常組織である重層扁平上皮でも発現がみられる。本研究の目的は、ケラチノサイトでのタイト結合の形成と細胞間透過性に対する EpCAM の機能を明らかにするために、Crispr/Cas9 システムにより EpCAM 遺伝子を破壊したケラチノサイトを作成し、三次元培養系を使って、重層化の過程におけるタイト結合形成と細胞間透過性の変化を調べることにある。マウスケラチノサイト株(K38)を、線維芽細胞を使わない上皮単独の三次元培養法で培養すると、気液界面培養開始後 2 週で十分な厚みの非角化重層扁平上皮様構造(口腔粘膜上皮様構造)が形成され、タイト結合膜蛋白 claudin (CL)1, 4, 6, 7 の発現をウエスタンブロットで確認した。この時、タイト結合本体を形成する CL4, CL6, CL7 はタイト結合が形成される細胞層表層に局在し、ZO-1 と共存した。しかし、CL1 はタイト結合形成部位には局在していなかった。EpCAM は基底層上層のケラチノサイトの細胞膜全体に局在した。また、細胞間電気抵抗値が気液界面培養 1 週で約 $60\Omega\cdot\text{cm}^2$ となり、その後 3 週まで維持されることが確認され、機能的タイト結合が形成されていると考えられた。

はじめは、EpCAM遺伝子の破壊をベクター方式でリポフェクタミンを使って実施したが、効率が悪く目的の細胞を取得できなかった。そこで、遺伝子の導入法をリポフェクタミンから、より効率の良いNucleofection(ロンザ社の遺伝子導入装置)に変更すると同時に、Cas9発現ベクターの代わりにCas9タンパクを細胞に導入するシステム(シグマアルドリッチ社)を取り入れた。さらに、ゲノム編集時にハイグロマイシン耐性ベクターを細胞に導入して、ゲノム編集された細胞を選択する効率を上げ、H31年度以後も本研究を継続して研究目的を遂行する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

2017 年度(平成 29 年度)

1. 宮園祥爾, 瀬尾皓, 松浦尚志, 佐藤博信, 稲井哲一郎

気液界面培養におけるタイト結合蛋白質の局在の変化

第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会

長崎大学坂本キャンパス: 2017 年 3 月 28 日~30 日

2. 宮園祥爾, 北河憲雄, 大谷崇仁, 瀬尾皓, 松浦尚志, 稲井哲一郎

ビタミン A 誘導体による角化抑制の解析

第 44 回福岡歯科学会総会

福岡歯科大学: 2017 年 12 月 3 日

2018年度(平成30年度)

1. 尾崎茜, 北河憲雄, 大谷崇仁, 緒方佳代子, 瀬尾皓, 小島寛, 稲井哲一郎

血清がケラチノサイトの角化, 分化およびタイト結合に及ぼす影響についての解析

第45回福岡歯科大学学会総会

福岡歯科大学本館: 2018年12月9日

2. 二階堂美咲, 北河憲雄, 大谷崇仁, 緒方佳代子, 瀬尾皓, 阿南壽, 稲井哲一郎

ストレス応答MAPキナーゼの活性化によるケラチノサイトのタイト結合についての解析

第45回福岡歯科大学学会総会

福岡歯科大学本館: 2018年12月9日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 稲井 哲一郎(教授)

ローマ字氏名: Tetsuichiro Inai

研究協力者氏名: 北河 憲雄

ローマ字氏名：Norio Kitagawa

研究協力者氏名：大谷 崇仁

ローマ字氏名：Takahito Otani

研究協力者氏名：二階堂 美咲

ローマ字氏名：Misaki Nikaido

研究協力者氏名：尾崎 茜

ローマ字氏名：Akane Ozaki

研究協力者氏名：宮園 祥爾

ローマ字氏名：Shoji Miyazono