

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11659

研究課題名(和文) 上皮ケラチノサイトの上皮間葉転換を制御する分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in keratinocytes

研究代表者

八田 光世 (Hatta, Mitsutoki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：30344518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)は上皮細胞が間葉系細胞様のフェノタイプに変化する現象である。しかし、そのフェノタイプ転換を制御する分子メカニズムの詳細は明らかではない。本研究は、上皮ケラチノサイトにおけるEMTを解析することでEMT誘導による発現変動遺伝子を同定し、さらに発現変動遺伝子のプロモーター領域におけるクロマチン修飾変化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮細胞が間葉系細胞様のフェノタイプに変化する上皮間葉転換(EMT)は、創傷治癒や口腔癌の浸潤・転移などに関わることが報告されており、その分子メカニズムの解明は重要な課題である。本研究の成果は、細胞のフェノタイプを制御する分子メカニズムについて理解を深めるとともに新しい創傷治療法や口腔癌の浸潤・転移を抑制する治療法へと繋げることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon in which epithelial cells shift toward the mesenchymal cell-like phenotypes. However, the molecular mechanisms underlying this phenotype conversion remain elusive. In this study an in vitro EMT model of keratinocytes was analyzed and the EMT-related alterations of gene expression and chromatin modifications were revealed.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：遺伝子発現 上皮-間葉転換

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) とは、上皮組織の細胞がその極性や細胞間接着を消失することで間葉系細胞様のフェノタイプに変化する現象である。これまで、様々な細胞モデルを用いた EMT 研究が行われ、EMT を誘導するサイトカイン・成長因子 (Transforming growth factor- β : TGF- β , Epidermal growth factor: EGF など)、そのシグナルに応答する転写因子 (SNAI ファミリーや TWIST ファミリーなど) が明らかにされてきた (Thiery et al., 2009)。一方で上皮組織の種類によって EMT に関与する因子が異なることも報告されており、それぞれの組織由来の細胞において詳細に解析する重要性も示されている。

申請者はこれまでエピジェネティックな遺伝子発現制御において重要な役割を担う転写因子およびクロマチン修飾 (DNA メチル化、ヒストン修飾) に関する研究をおこなってきた。口腔癌細胞を用いた研究から、ヒストンメチル化酵素を含むポリコム複合体 (PRC2) がケラチン 13 (KRT13: 上皮分化マーカー) 遺伝子領域に抑制性クロマチン修飾を形成し、サイレンシングに関与することを見出した。そして PRC2 阻害薬 (DZNep) により KRT13 遺伝子サイレンシングが解除されること、さらに口腔癌細胞の遺伝子発現パターンが変化し上皮細胞フェノタイプ (細胞間接着) が回復することを明らかにした (Naganuma et al., 2014, Hatta et al., 2015)。それらの知見から、細胞のフェノタイプを決定する遺伝子発現パターンがエピジェネティックな機構でダイナミックに制御されていることが予測された。口腔粘膜は上皮ケラチノサイトからなる重層扁平上皮であるが、創傷治癒時には上皮ケラチノサイトが運動性を獲得して創部を被覆する。また口腔粘膜に発生する口腔扁平癌の予後に影響を及ぼす癌細胞の浸潤・転移にも EMT との関連が報告されている (Smith et al., 2013)。それらの細胞における EMT の分子メカニズムを明らかにすることは創傷治癒や口腔扁平上皮癌の分子病態の理解、さらに新しい創傷治療法や口腔癌の浸潤・転移を抑制する治療法の開発に繋がると考えられる。そこで申請者は扁平上皮由来細胞のフェノタイプ転換の基盤となる遺伝子発現パターン変化を制御する分子機構を明らかにするため、エピジェネティック制御装置 (クロマチン修飾および転写因子複合体) に焦点を当てた本研究を計画した。

2. 研究の目的

上皮ケラチノサイトの EMT においてエピジェネティック制御装置 (クロマチン修飾および転写因子複合体) がどのように遺伝子発現パターン変化を制御するのか、さらに口腔癌細胞における EMT 関連遺伝子の発現異常とエピジェネティック制御装置の変異との関連を明らかにすることを目的に本研究を行なった。

3. 研究の方法

(1) EMT 誘導モデル

ヒト不死化ケラチノサイト HaCaT の TGF- β 処理による EMT 誘導モデル系を用いた。細胞形態の変化は顕微鏡観察および F-actin 染色により確認した。上皮マーカーと間葉マーカーの発現変化は qRT-PCR、ウエスタンブロット、免疫細胞染色により解析した。

(2) EMT プログラムにより発現変動する遺伝子の網羅的解析

コントロールおよび TGF- β により EMT 誘導した HaCaT 細胞から totalRNA を抽出し、DNA マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現変化を解析した。さらに qRT-PCR により発現変化を定量的に確認した。

(3) 発現変動遺伝子ゲノム領域におけるクロマチン修飾パターンの解析

コントロールおよび TGF- β により EMT 誘導した HaCaT をホルムアルデヒドで固定、さらに超音波破碎して断片化クロマチンを調製した。ヒストン修飾 (リジン残基のメチル化やアセチル化など) を認識する抗体、RNA ポリメラーゼ II に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) をおこなった。

(4) EMT プログラムにおける転写因子 SNAI2 の機能解析

テトラサイクリン誘導性 SNAI2 発現 HaCaT 細胞および SNAI2 ノックダウン HaCaT 細胞を作製し、細胞の形態変化や遺伝子発現変化について検討した。

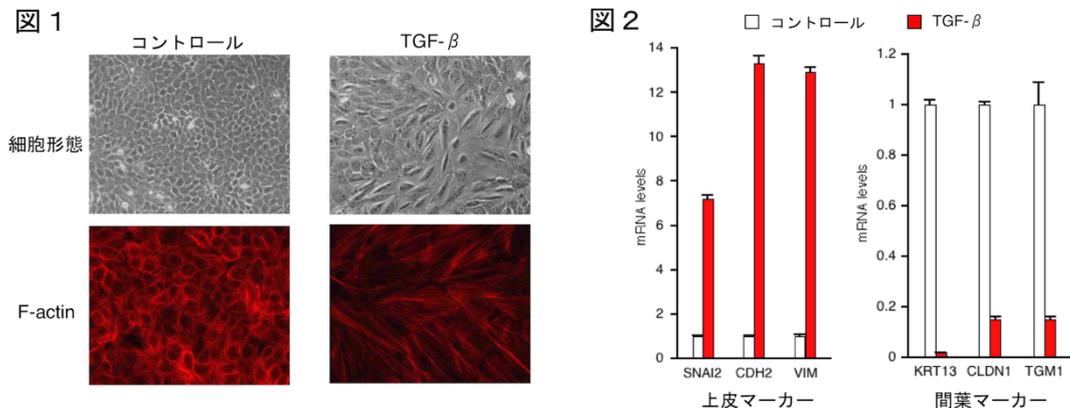
(5) 口腔癌細胞における EMT 関連遺伝子の発現解析

HaCaT 細胞の TGF- β 誘導 EMT における遺伝子発現変化と低分化型口腔癌細胞 (SAS) の EMT 関連遺伝子レベルを比較検討した。

4. 研究成果

(1) EMT 誘導モデル

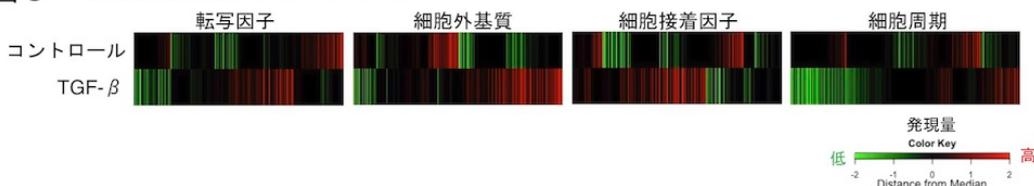
HaCaT は TGF- β 処理から 48~72 時間後には、敷石状から細長い細胞形態となった。F-actin の走行も皮質様からストレスファイバーへと変化することを確認した (図 1)。さらに qRT-PCR により間葉マーカー遺伝子 (SNAI2, CDH2, VIM) の mRNA 発現が上昇し、上皮マーカー遺伝子 (KRT13, CLDN1, TGM1 など) は発現低下することが明らかになった (図 2)。またウエスタンブロットや免疫細胞染色により SNAI2 タンパクの増加と KRT13 タンパクの減少を確認した。



(2) EMT プログラムにより発現変動する遺伝子の網羅的解析

DNA マイクロアレイにより TGF- β 誘導 EMT における遺伝子発現変化を調べたところ、発現上昇 (2 倍以上) および発現低下 (50%以下) したものが約 1300 スポット検出された (図 3)。さらに、顕著な発現変動を示す遺伝子 (P53INP2, SOX4, FOXQ1, FBXO32, AKAP12, MARCKSL1, CALD1, FBLIM1, GABARAPL1, SGK1 など) を見出し、qRT-PCR にて定量的に発現変化を確認した。

図 3 発現変動遺伝子のヒートマップ



(3) 発現変動遺伝子ゲノム領域におけるクロマチン修飾パターンの解析

KRT13 遺伝子のゲノム領域におけるヒストンの修飾状態を解析したところ、TGF- β 誘導 EMT によりプロモーター領域のヒストン H3 リジン 27 のアセチル化が減少し、トリメチル化が増加することが明らかになった。また転写開始点におけるヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化が減少し、RNA ポリメラーゼ II のリクルートが抑制されていることが確認された (図 4)。

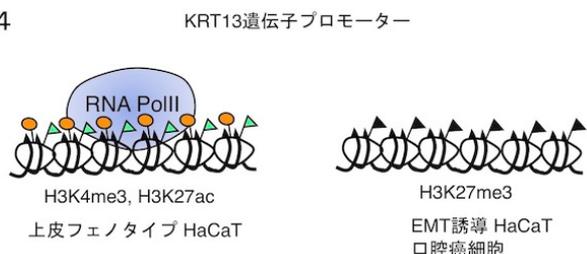
(4) EMT プログラムにおける転写因子 SNAI2 の機能解析

Ty1 タグを付加した SNAI2 をテトラサイクリン誘導性に発現させるレトロウイルスベクターを構築したのち、組換えレトロウイルスにて HaCaT 細胞に感染させて目的遺伝子をゲノムに組み込ませてテトラサイクリン誘導性 SNAI2 発現 HaCaT 細胞を作製した。ドキシサイクリン処理による SNAI2 発現が細胞形態に影響を与えるか検討した。光学顕微鏡での観察および F-actin 染色では大きな形態変化は認められなかった。次に DNA マイクロアレイにより SNAI2 依存的な遺伝子発現変化を調べたところ、発現上昇 (2 倍以上) および発現低下 (50%以下) したものが約 800 スポット検出された。また TGF- β 誘導 EMT における遺伝子発現変化と同様の挙動を示す遺伝子群を見出すことができた。さらに、RNAi により SNAI2 発現をノックダウンした HaCaT 細胞を作製し、細胞の形態変化や遺伝子発現変化について解析している。

(5) 口腔癌細胞における EMT 関連遺伝子の発現解析

HaCaT 細胞の TGF- β 誘導 EMT における遺伝子発現変化と低分化型口腔癌細胞 (SAS) の EMT 関連遺伝子レベルを比較検討したところ、上皮マーカー (KRT13, TGM1) は EMT および SAS 細胞において同様に抑制されるが、間葉マーカー (FN1, VIM, CDH2, VIM) の発現パターンは異なることが明らかになった。これまでのクロマチン修飾の解析結果から、EMT および SAS 細胞での KRT13 遺伝子の発現抑制にはプロモーター領域のヒストン H3K27 メチル化が関与することが示唆された (図 4)。

図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatta M, Miyake Y, Uchida K, Yamazaki J	4. 巻 496(2)
2. 論文標題 Keratin 13 gene is epigenetically suppressed during transforming growth factor- 1-induced epithelial-mesenchymal transition in a human keratinocyte cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 381-386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.01.047.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mitsutoki Hatta, Yuki Miyake, Kunitoshi Uchida, Jun Yamazaki
2. 発表標題 Suppression of keratin 13 expression by transforming growth factor- 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human keratinocyte HaCaT cells
3. 学会等名 第91回日本薬理学会年会 / 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議 WCP2018-18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Miyake, Mitsutoki Hatta
2. 発表標題 The role of transcription factor SNAI2 in EMT during wound healing
3. 学会等名 2019 TAO 32nd Annual Meeting & 8th Resident Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山崎 純 (Yamazaki Jun) (50230397)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	

