

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：19K16726

研究課題名（和文）ミスマッチ修復に依存したアポトーシスのエピゲノム解析

研究課題名（英文）Epigenomic analysis of the induction of apoptosis

研究代表者

武石 幸容（Takeishi, Yukimasa）

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：00758055

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000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にフェノタイプを変化させる現象である。このフェノタイプ変化は多種多様な遺伝子、タンパク質の発現が協調的に変化することが知られている。しかしEMTの分子機序、並びに誘導させる制御因子の特定もできていない。本研究はEMT誘導のモデルとなっている正常細胞を用いてその仕組みを解析する。また同様の手法で口腔癌細胞をEMT誘導し、正常細胞との違いを比較することでその違い等を見出そうと計画した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮間葉転換(EMT)は、創傷治癒、細胞/組織の線維化、癌の転移/浸潤に関与することが報告されている。その分子機序を明らかにすることは学術的意義を満たすだけでなく、これら現象に課題を解決させることで社会的意義も満たすことができる。

本研究の成果は上皮系細胞が後天的/一時的にフェノタイプ変化を起こす現象、並びにその制御する分子機序の理解を深め、創傷治癒の課題である癒痕化の抑制や口腔癌の転移/浸潤を抑制する新規治療法の提案につながると考えている。

研究成果の概要（英文）：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon in which epithelial cells change to become mesenchymal-like cells. This phenotypic change is known to be a coordinated change in the expression of a wide variety of genes and proteins. However, the molecular mechanism involved in EMT is unclear.

In this study, we analyzed EMT mechanism using normal cells as a model for EMT induction. We also planned to find the differences by comparing by OSCC with normal cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：上皮間葉転換 癌 クロマチン動態

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景 (284)

上皮系の細胞が後天的に間葉系の形質(遊走/浸潤能)を獲得するフェノタイプ変化のことを上皮間葉転換(EMT, Epithelial Mesenchymal Transition)という。この EMT 誘導により高い遊走能、及び浸潤能をもった細胞は、創傷治癒、細胞/組織の線維化、がんの転移/浸潤に関与することが報告されている。そのため EMT はそのフェノタイプ変化に伴い多種多様な遺伝子、タンパク質の発現が協調的に変化することが知られている。しかし EMT の分子機序、並びに誘導させる制御因子の特定もできていない。

近年では可逆的(間葉系 上皮系)な変化誘導である間葉上皮転換も報告され、誘導だけでなく、EMT の維持といった細胞の環境との関連にも研究が進められている。

2. 研究の目的 (323)

上皮細胞が間葉系細胞への細胞へ変化する上皮間葉転換(EMT)は、胚発生(Type I)だけでなく組織(臓器)の繊維化/創傷治癒(Type II)、そして 癌の浸潤、転移(Type III)に関与している。近年、EMT は単なる細胞の形質変化だけでなく、炎症誘導性の EMT を介して DNA 損傷耐性、薬物耐性、アポトーシス耐性に関与することが強く示唆されている。本研究では EMT によって生じると予想されるクロマチン動態の変化に注目し、エピゲノム研究の手法を取り入れながら TGF- β による EMT 誘導前後のクロマチン動態の変化、また正常細胞とがん細胞の EMT 誘導時の違いを明らかにすることを目指した。もしクロマチンの修飾や構造変化に必須の因子を特定し分子メカニズムを明らかにすることで、EMT を起こしている癌に対する抗癌剤の有効性など細胞を用いて検討する。

3. 研究の方法 (297)

ヒト表皮角化細胞株である HaCaT 細胞(HaCaT)はサイトカイン TGF- β を添加し培養することで EMT 様な細胞の形態、タンパク質の発現を変化させる。HaCaT を正常細胞のコントロール、そして比較対象として口腔癌細胞(OSCC)においても同様の現象が確認できるか検証を行った。上記の様な発現タンパク質の変化が生じる場合、転写因子がクロマチン構造を変化させて発現制御をしていることが予想される。次にクロマチン構造の制御に関与しているヒストンの修飾状態で解析する。解析には TGF- β 添加前後の細胞抽出液を用いてヒストン修飾を特異的に検出できる抗体を用いたウエスタンブロット法にて解析する。EMT 由来のクロマチン構造変化が TGF- β による EMT 誘導で確認出来次第、次世代シーケンサーを使用した網羅的解析を行う計画である。

4. 研究成果 (1568)

1. TGF- β 添加による EMT 誘導

上記の様に TGF- β を添加し培養することで HaCaT は既に EMT 様に変化する報告が出ている。そこで HaCaT をコントロールとして OSCC である SAS、HSC-3、HSC-4 においても細胞の形態とタンパク質の発現変化を解析した。

a. 細胞の形態

HaCaT は、TGF- β を添加し培養することで細胞の形状が細長い扁平状に変化することが確認された(図 1 上)。また F-アクチン特異的に結合するペプチド ファロイジンを用いて細胞染色を行った結果、間葉系細胞で見られるアクチンフィラメント(ストレスファイバー)の形成が確認できた(図 1 下)。TGF- β 依存的なこの変化は他の報告と一致している。

OSCC である SAS、HSC-3、HSC-4 においても同様に検討した(図 1 上)。その結果、SAS と HSC-4 は細胞質が大きく肥大化する変化が観察された。両細胞のファロイジン染色においてもアクチンフィラメント(ストレスファイバー)の形成が確認できた(図 1 下)。

b. タンパク質の発現変化

HaCaT は、TGF- β を添加し培養することで上皮系マーカー(KRT13, KRT15, E-cadherin)が減少し、間葉系マーカー(FN, N-cadherin)の増加が見られた(図 2)。これは表皮細胞である HaCaT が間葉系細胞の特性を獲得しつつあることを示す。SAS、HSC-3、HSC-4 においても同様に検討した結果、HSC-4 が HaCaT と似た発現量の変動を示した(図 2)。SAS や HSC-3 においては部分的なタンパク質の挙動は一致していたが KRT13, FN などは検出感度以下だったため評価することができなかった。

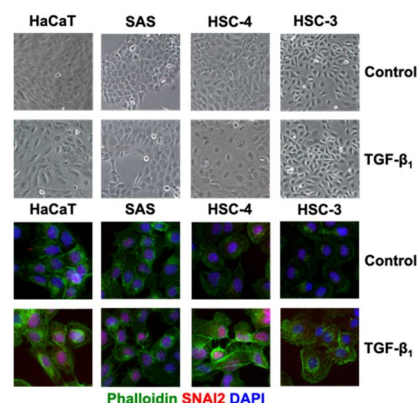


図 1

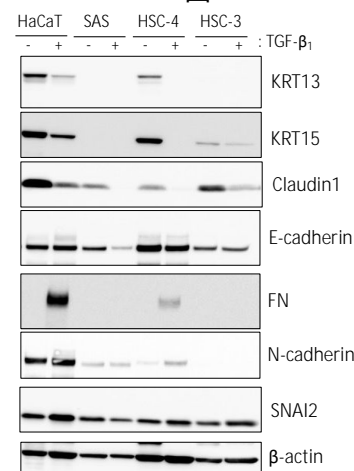


図 2

以上の結果より HaCaT における TGF- β に依存した変化は HSC-4 をはじめとした OSCC においても EMT 様の変化を起こすと考えられる。ただし HSC-3 は細胞の形態変化が見られず、HSC-3 と SAS の発現タンパク質の変化は一部であったことから程度の差が存在し、部分的な EMT 様な変化だったと考えられる。

2. ヒストン修飾の解析

先の結果より TGF- β 依存的にタンパク質の発現が変化していた。これはクロマチン動体に変化し、上皮系細胞、間葉系細胞に関わるタンパク質の転写/発現制御が変化したと考えられる。それを検証するためにホールセルであるが TGF- β 添加の有無におけるヒストン修飾の変化を調べた(図 3)。

HaCaT において H3K9Me3 の大きな変化は認められなかったが、H3K4Me3 の減少、及び H3K27Me3 の増加が認められた。一般的に H3K4Me3 は転写活性化、H3K27Me3 は転写抑制に働くと考えられている。そのため HaCaT における結果による矛盾は生じていない。しかし TGF- β 添加によってホールセルの転写全体が減弱する傾向を示した結果は意外であった。OSCC の培養細胞においても HaCaT と比較してシグナルの程度の差あったが各細胞のシグナルの変化の傾向は同様であった。

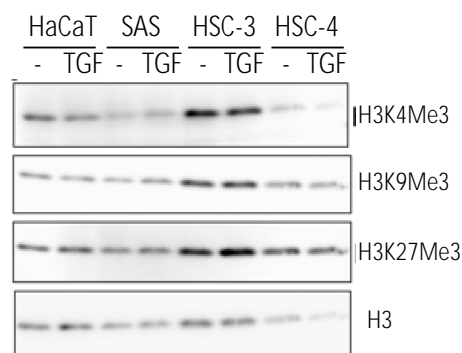


図 3

先の解析はホールセルによる解析であったため個別の転写活性の変化は検証することができない。そこで ChIP-Seq 法を用いた網羅解析を行う計画であった。H3K4Me3 抗体を購入し ChIP を行ったが、解析に十分な収量を研究期間内に準備することができなかった。今後の研究において改善し EMT に関わる因子を中心に転写活性を個別に明らかにしたい。

3. ヒストン修飾阻害薬を用いた解析

HaCaT は TGF- β による EMT 様誘導時にはヒストン修飾が変化していた。そこでヒストン修飾阻害薬等を用いることで TGF- β 添加と同様の変化が起きるかどうか検証を行なった。

ヒストンメチル化酵素 EZH2 に対する阻害薬 Dz-Nep(3-deazaneplanocin A)、エピジェネティック研究の標的である BET ファミリータンパク質 BRD に対する阻害薬 JQ-1(+), OTX015 を用いた(図 4)。その結果、Control と比較し、各阻害薬は細胞の形態の変化は見られた。しかし細長い扁平状に変化する TGF- β とは異なる変化が見られた。

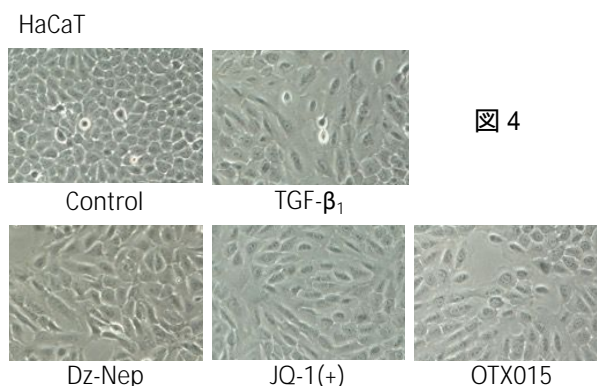


図 4

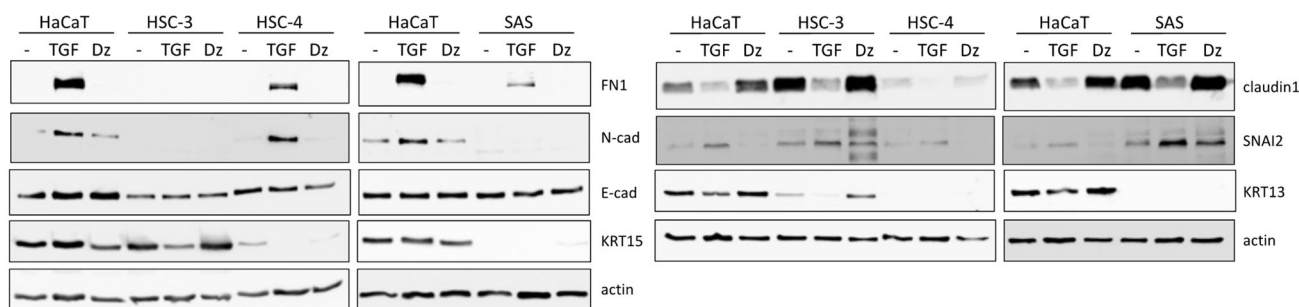


図 5

また Dz-Nep 処理によるタンパク質の発現変化を調べた(図 5)。各細胞の TGF- β 処理と Dz-Nep 処理を比較しても大きく異なりヒストン修飾阻害薬による EMT 様誘導を見出せなかった。

細胞の形態変化、タンパク質の発現変化を比べても TGF- β 依存的な EMT 様な変化は見られなかった。これはこの現象が単純なヒストン修飾関連因子単独の現象ではなく、いくつかの制御因子による複雑な現象であることの証左ともいえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyake Yuki, Nagaoka Yoshiyuki, Okamura Kazuhiko, Takeishi Yukimasa, Tamaoki Sachio, Hatta Mitsutoki	4. 巻 22
2. 論文標題 SNAI2 is induced by transforming growth factor? 1, but is not essential for epithelial?mesenchymal transition in human keratinocyte HaCaT cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2021.10558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagaoka Yoshiyuki, Takeishi Yukimasa, Miyake Yuki, Takeda Kana, Okamura Kazuhiko, Yao Yuan, Motomura Kaori, Daitoku Hiroaki, Fukamizu Akiyoshi, Hatta Mitsutoki	4. 巻 51
2. 論文標題 SOX4 reversibly induces phenotypic changes by suppressing the epithelial marker genes in human keratinocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-023-09035-7	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------