

林田靖 論文内容の要旨

主 論 文

Calreticulin represses E-cadherin gene expression in Madin-Darby canine kidney cells via Slug.

MDCK 細胞においてカルレティキュリンは Slug を介して E-カドヘリン遺伝子の発現を抑制する

林田靖、浦田芳重、室井栄治、河野貴章、宮田康好、野俣浩一郎、
金武洋、近藤宇史、井原義人

(J Biol Chem. 281 巻 43 号 32469-32484 2006 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻
(主任指導教員：近藤 宇史教授)

(緒言)

E-カドヘリンは上皮細胞において細胞間接着分子として組織構造の形成や維持に中心的な役割を果たしており、その破綻が種々の癌細胞で見られる浸潤能の獲得や転移につながると考えられており、その制御には数多くの分子が介在している。

一方、カルレティキュリン (Calreticulin) は粗面小胞体に存在する Ca^{2+} 結合性分子シャペロンであり、 Ca^{2+} ホメオスタシス、細胞-細胞間の情報伝達、遺伝子発現調節、小胞体での糖タンパク質合成、核輸送など様々な生理機能を有することが近年報告されている。しかし、カルレティキュリンと E-カドヘリンとの関係についてはまだ明らかにされていない。また内因性カルレティキュリンの発現は組織で異なっており、例えば腎臓では発現が低いとされるが、腎悪性腫瘍細胞ではカルレティキュリンが高発現している例も知られている。これらのことから、カルレティキュリンが癌と何らかの相関を有する可能性が示唆されるが、その病態的意義はよくわかっていない。そこで我々はイヌ腎尿細管上皮由来の MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞を用いてカルレティキュリンと E-カドヘリンの関連性を検討した。

(対象と方法)

1. MDCK 細胞にカルレティキュリン遺伝子発現ベクターをリポフェクタミン 2000 を用いて導入した。G418 で選択した後に安定したカルレティキュリン過剰発現細胞を作製、細胞抽出液を SDS-PAGE で電気泳動した後に免疫学的手法でタンパク質の発現を測定した。
2. 細胞浸潤は Matrigel-coated Boyden chamber plate を用い、24 時間培養で膜を透過したものについて、膜裏側に到達した細胞を固定、crystal violet 染色後に、洗浄、溶解し、分光光度計により比色定量で評価した (マトリゲル浸潤アッセイ)。細胞増殖は crystal violet 染色を用いた比色定量により評価した。

3. E-カドヘリン、転写抑制因子 Slug などの遺伝子発現は RT-PCR 法や Northern blot 法で解析、評価した。E-カドヘリン遺伝子のプロモーター活性はルシフェラーゼ遺伝子を用いたプロモーターリポーターアッセイで測定した。
4. Ca^{2+} の細胞内流入量は、 $^{45}Ca^{2+}$ の培養細胞内への取込みを経時的に定量、評価した。また Ca^{2+} チャネルである TRPV5, TRPV6 等の発現を測定した。

(結果)

1. カルレティキュリンをコントロールに比し約 3 倍に過剰発現させた MDCK 細胞は形態的に epithelial-mesenchymal transition (上皮-間葉系転換)をきたし、細胞間接着が減少していた。
2. カルレティキュリン過剰発現細胞は間葉系のマーカー蛋白であるフィブロネクチン、N-カドヘリン、ビンキュリンの発現が上昇し、マトリゲル浸潤アッセイにて細胞浸潤を認めた。
3. E-カドヘリンの発現は、コントロールでは高発現していたが、カルレティキュリン過剰発現細胞では蛋白レベルでも、mRNA レベルでも著減しており、転写抑制因子のひとつと考えられる Slug が高発現していた。
4. E-カドヘリン遺伝子転写調節を行う E-box 領域に Slug が結合して E-カドヘリンの遺伝子発現を抑制した。
5. カルレティキュリン過剰発現細胞では、thapsigargin 感受性小胞体 Ca^{2+} の増加が認められ、小胞体から細胞質内への Ca^{2+} の遊離が上昇していた。一方 Ca^{2+} チャネルである TRPV5 の高発現も認められた。Slug 遺伝子の発現は Ca^{2+} 依存性であった。

(考察)

腎上皮細胞においてカルレティキュリンが Slug を介して細胞接着因子 E-カドヘリン遺伝子の発現を制御している機構を明らかにした。カルレティキュリン過剰発現細胞では E-カドヘリンの発現が低下していたが、その発現抑制機構には主として小胞体による Ca^{2+} ホメオスターシスが関与していると思われた。即ち、カルレティキュリンは細胞内 Ca^{2+} 上昇を介して、E-カドヘリン遺伝子抑制に働く Slug の発現を誘導することによって上皮細胞の形質転換をきたすと考えられた。

以上の結果から、癌細胞の浸潤転移にカルレティキュリンが関与するのではないかという新しい知見を見出した。しかし、これだけではカルレティキュリンが癌の悪性度の新しい指標であるとは結論づけられない。また、E-カドヘリン以外の上皮-間葉系転換の制御に関わると考えられる分子として、フィブロネクチン、N-カドヘリン、ビンキュリンなどの役割の変化とその制御機構についても詳細な解析が必要である。今後は癌化との関係をさらに明らかにするために癌細胞転移実験動物モデルを用いた in vivo study などでの更なる検討が必要であると考えられる。