

1. 神経科学シリーズ

cDNA full-length clone の導入および siRNA 法を用いた解析による 培養下垂体腺腫細胞におけるシグナル伝達経路の研究 (5)

吉田 大蔵¹ 寺本 明²

¹日本医科大学武蔵小杉病院脳神経外科

²日本医科大学大学院医学研究科神経病態解析学

1. Neuroscience Series

Investigation of Signaling Pathways in Cultured Pituitary Adenoma Cell by Full-length Clone Transfection and Gene Silencing with the Small Interfering RNA Method (5)

Daizo Yoshida¹ and Akira Teramoto²

¹Department of Neurosurgery, Nippon Medical School Musashi Kosugi Hospital

²Department of Clinical Neuroscience, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

Recently, complementary (c) DNA full-length clone transfection and gene silencing with the small interfering (si) RNA method have emerged as new methods for elucidating intracellular signaling pathways in cultured cell lines. However, these methods have rarely been used in the field of neuroendocrinology. Recent reports have shown the presence of a novel matrix metalloproteinase (MMP)-inhibiting cell membrane-anchored glycoprotein designated "reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs" (RECK). The purpose of this study was to elucidate the role of RECK in the cell invasion of pituitary adenomas and its contribution to signal transduction. The function of RECK in cell invasion was investigated by comparing data obtained from full-length RECK clone transfection and gene silencing with RECK messenger RNA-targeting siRNA. RECK expression was confirmed by means of real-time reverse transcription polymerase chain reaction and Western blotting. Levels of MMP-2 and MMP-9 and of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 were measured with zymography and reverse zymography, respectively. Cell invasion was examined with a 3-dimensional invasion assay. The signal cascade was investigated with cDNA microarray analysis. As expected, expression of RECK was elevated upon cDNA transfection and decreased with siRNA. We observed elevations of MMP-2 and MMP-9 expression and consequent 3-dimensional cell invasion in cells under-expressing RECK. However, expression of tissue inhibitor of metalloproteinases was not affected by RECK. cDNA microarray analysis revealed that RECK additionally up-regulates growth hormone-releasing hormone receptor and latrophilin 2 at the transcriptional level. Our findings collectively suggest that RECK regulates the cell-signalling pathway and plays a critical neuroendocrinological role in the pituitary adenoma cell line.

(日本医科大学医学会雑誌 2008; 4: 201-204)

Correspondence to Akira Teramoto, MD, PhD, Department of Clinical Neuroscience, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: a-tera@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

Key words: growth hormone releasing hormone receptor, matrix metalloproteinase, pituitary adenoma, reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs

1. はじめに

近年細胞内シグナル伝達に関する研究が進み、様々な分野で解明が行われている。正常神経細胞においてもシグナルクロストークが明らかにされ、同時にグリア由来の glioma, glioblastoma においても細胞浸潤、血管新生といった現象における腫瘍細胞でのシグナル伝達が検討され、腫瘍成長の解明にむけて研究が進捗している。一方で視床下部や正常下垂体のホルモン調節も動物モデルを用いて検討がなされてきた。ところが下垂体腺腫という良性腫瘍においては培養細胞を用いた研究はほとんど見られず、下垂体ホルモン分泌に関しても細胞内シグナルを対象とした研究はきわめてまれであるが、この問題についてわれわれは取り組んできた。一般的に細胞のシグナルカスケードを研究するにあたって細胞にシグナルをつかさどる遺伝子の cDNA を導入することで遺伝子を強制発現させるか一方で RNA 干渉を行うことで mRNA 発現を抑制してシグナルの変化を検索することが多い。特に RNA 干渉法は近年 short interference RNA (siRNA) 法が確立された¹⁾。従来 target にする mRNA に対する相補的な single-stranded oligonucleotide を導入していたが導入効率が低く、発現抑制時間も数時間とはなはだ微弱なために pseudo-negative な結果を含んでいたために不確かな干渉方法に終わっていたが、double-stranded oligonucleotide を用いた siRNA 法が確立され、導入効率も 90% を超え、10 倍以上の抑制効果、さらに抑制持続時間も 1 週間近くえられることを今回の研究を含めて確認できた。

このような研究上の現状をふまえ、本稿では細胞浸潤のシグナルパスウェイとして注目されている細胞表面の Reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) が介在するヒト下垂体腺腫細胞における細胞浸潤に関する研究を報告する。

2. 研究

HP-75 (ヒト下垂体腺腫細胞株) を DMEM 培地に継続培養した。RECK full-length cDNA を vector を使用して E. Coli に heat shock 法で導入し、subcloning を行った。アンピシリンを含む寒天培地で培養後 colony を抽出し、plasmid を精製した。一

方で siRNA の配列は online system から構造を決定した。同時に positive control としてヒトの遺伝子配列にはない scramble oligo を選択し (5'-gcgcgctttgtaggattcg), ターゲットとして作成した。両者とも濃度は 50nm としてカチオン酸を transfectant として培養した HP-75 細胞に導入した。比較対照として siRNA, full-length cDNA clone, control (未投与群), scramble oligo, mock (transfectant 試薬のみ), および empty vector を導入した細胞を作成し比較検討した。導入効果は real-time RT-PCR を用いて endogenous control としての β -actin との相対的発現変化を定量的に解析し、同時に蛋白レベルでは Western blotting で比較解析した。

matrix metalloproteinase の酵素活性は gelatin zymography で検討した。細胞浸潤の変化は 3-D cell invasion assay として人工 peptide の中に上記の transfect した細胞を FITC でラベルしたものを細胞塊として植え込み、倒立蛍光顕微鏡で 72 時間まで連続撮影をして細胞集団の広がりや面積を比較した。

遺伝子を導入した後の遺伝子発現 profiling には cDNA microarray を使用した。sample は Cy3, Cy5 でそれぞれタグをした。画像解析ソフトウェアを使用して発現変化を解析した後に online data analysis に基づいて、遺伝子の塩基配列データを確認した。

結果として、HP-75 細胞では RECK を強制発現させた細胞は MMP-2, -9 の活性化や分泌が低下し、一方で gene silencing させた細胞では逆に上昇していた (Fig. 1)。3-D invasion assay では同様に RECK は細胞浸潤を抑制していた (Fig. 2)。cDNA microarray の結果 RECK は latrophilin 2, resistin like beta, zinc finger protein B-14, and elastin microfibril interfacier 3 を発現促進していたが、basic helix-loop-helix domain containing, class B, nuclear factor I/A, さらには growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR) の発現が抑制された (Fig. 3)。

したがって下垂体腺腫細胞では細胞外で MMP-2, -9 の活性を RECK が抑制し、同時に細胞内では cell cycle を制御する signal cascade を制御していた。

3. 考察およびまとめ

下垂体腺腫は初診時 12~28% の症例で周辺の正常組織に浸潤している。現在この下垂体腺腫浸潤の分類

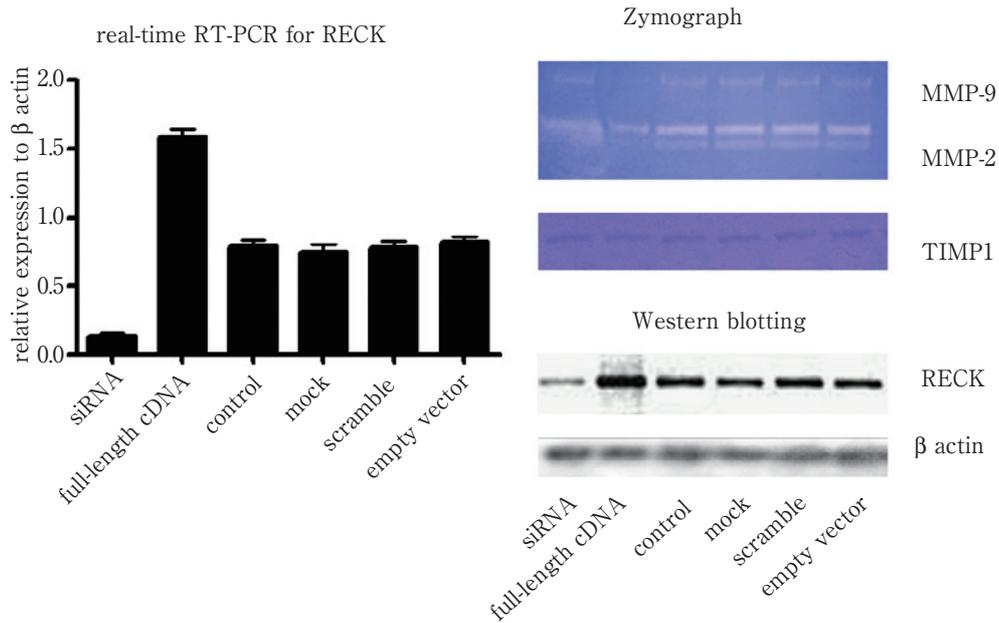


Fig. 1 RECK を強制発現させた HP-75 細胞は MMP-2, -9 の活性化や分泌が低下し, 一方で gene silencing させた細胞では逆に上昇している.

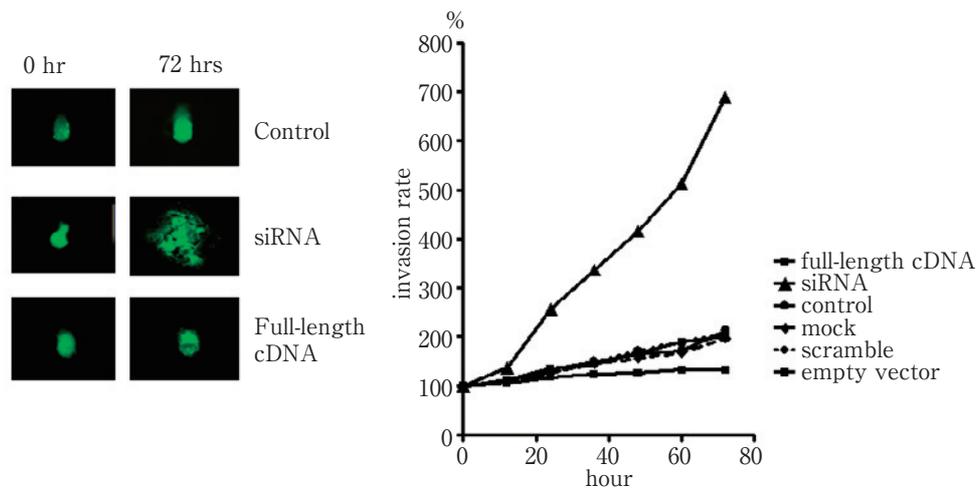


Fig. 2 3-D invasion assay で RECK は細胞浸潤を抑制している.

は海綿静脈洞への浸潤を分類した Knosp grading がある². トルコ鞍内の下垂体腫瘍が海綿静脈洞への腫瘍浸潤の基準として上下の内頸動脈の内縁と外縁をそれぞれ結ぶ線を指標にしている. 内頸動脈外縁を結ぶ線を越えて浸潤した grade 4 では, 蝶形骨洞や頭蓋内からの直達手術による全摘率の比率がきわめて低いことが知られている. この下垂体腺腫の腫瘍浸潤の分子生物学的な機構についての報告は少ない. 悪性腫瘍における細胞浸潤の機構として細胞外空間 extracellular space で collagen type I, III, IV を基質とする酵素 matrix metalloproteinase (MMP)-2 または-9 と阻害

因子である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, -2 のバランスによって MMP が優位に分泌された部分が破壊されその後に腫瘍細胞が移動することで腫瘍細胞が浸潤する³. 下垂体腺腫においても MMP-2, -9 は分泌されて同様に浸潤することが報告された. 膜結合型の新規 MMP 阻害因子 RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) が近年発見された⁴. RECK 遺伝子を欠損させたマウスは胎児の内に死んでしまうことから, 発生に必須の分子と考えられる. 一方, RECK タンパク質の量は多くのがんで著しく低下しており, また,

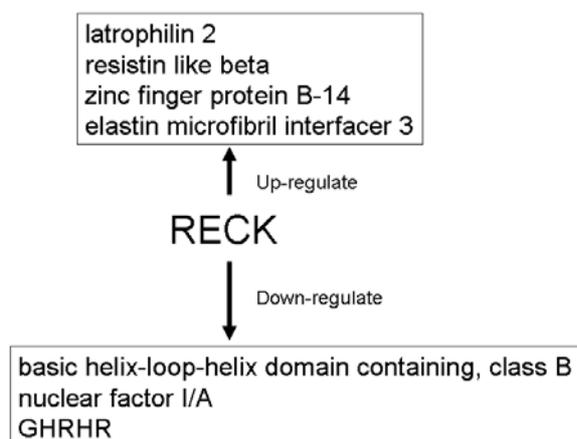


Fig. 3 cDNA microarrayの結果RECKはlatrophilin 2, resistin like beta, zinc finger protein B-14, and elastin microfibril interfacer 3を発現促進し、一方で basic helix-loop-helix domain containing, class B, nuclear factor I/A, growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR) の発現を抑制することが明らかになった。

RECKの量の低下とがんの悪性度(患者の死亡率)との間には相関性が見られる。また、RECKが低下したがん細胞で強制的にRECKを発現させるという動物実験では、がんの血管新生、浸潤、転移などが抑制された。すなわち、RECKは、MMPに拮抗してECMを守る働きを持ち、その量の低下が、ECMの破壊を伴う血管新生やがんの浸潤、転移などの病態に関わるものと考えられた。この分子は従来知られていた分泌型のMMPおよびMMP阻害因子(TIMPファミリー)とは違って細胞表面に結合しているため細胞の挙動制御に直接関わる細胞内シグナルに関与している可能性が高い。しかし下垂体腺腫における報告はなかった。今回の結果では細胞浸潤のみならず、細胞の増殖やECMのremodelingの際の重要なシグナルを制御していることが示唆された。

Short interference RNA (siRNA) 細胞に導入された二本鎖RNAが、それと同じ配列を持つ遺伝子の発現(タンパク質合成)を抑制する現象のことです。この方法は、標的遺伝子(mRNA)を破壊することで

発現を抑制するため、遺伝子の機能解析に有効な方法として現在注目されている。RNAiは、配列のわかっている遺伝子を破壊することができるため、遺伝子機能の解析に有効で、細胞への導入量が少量の割に比較的長時間効果が持続する。具体的にはsiRNAは細胞への導入後、マルチ・タンパク質複合体と結合し、RISC(RNA-induced silencing complex)を形成する。このsiRNA-タンパク質複合体が、siRNAと相同性を持つmRNAに結合し、RISCヌクレアーゼ活性によりsiRNA-mRNAの結合部位が切断されるため、標的遺伝子の発現が抑制される¹⁾。

以上のようにcDNA full-length cloneの導入およびsiRNA法といった遺伝子の強制発現と発現抑制を同時に行えばpseudo-positiveあるいはpseudo-negativeな解析から免れることが可能であり、同時にcDNA microarrayを用いれば網羅的に発現解析が可能となり、多種類のシグナル経路の解析が行える点からきわめて応用範囲が広範な手法であると考えられた。

文 献

1. Obeido M: ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *J Immunol* 2008; 181: 2533-2543.
2. Bao Y, Yoshida D, Morimoto D, Teramoto A: Expression of laminin beta2: a novel marker of hypoxia in pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2006; 17: 251-261.
3. McClung HM, Thomas SL, Osenkowski P, Toth M, Menon P, Raz A, Fridman R, Rempel SA: SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neurosci Lett* 2007; 419: 172-177.
4. Hou C, Zhang Y: Expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus: links to disease activity, damage accrual and matrix metalloproteinase 9 secretion. *J Int Med Res* 2008; 36: 704-713.

(受付: 2008年7月31日)

(受理: 2008年8月19日)