

ヒト結腸がん細胞 HCT116 の脂肪滴蓄積に関する細胞評価系の構築

Establishment of a cellular evaluation system for lipid droplet accumulation in human colon cancer cell HCT116

杉田 将
指導教員 杉山 友康

東京工科大学大学院 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻 機能性 RNA 工学研究室

がん細胞に蓄積させた脂肪滴を蛍光試薬で染色し、蛍光顕微鏡と FACS によって確認した。脂肪滴蓄積を抑制した細胞についても同様に確認した。得られた結果は、がん細胞の脂肪滴蓄積を抑制する新規 shRNA をスクリーニングするための基礎となるデータとなる。

キーワード (必須) : RNAi, Lipid droplet, FACS

1. 緒言

RNA interference (RNAi) とは、21 塩基ほどの短い二本鎖 RNA と、RISC と呼ばれるヌクレアーゼの一種によって、それに相補的な配列を持つ細胞内の mRNA が特異的に分解される現象である。この現象を利用して、標的とする遺伝子の mRNA に相補的な配列を持つ短い二本鎖 RNA (siRNA) を細胞に導入し、目的の遺伝子の発現を特異的に抑制することが可能となる。このような RNA は、設計したプラスミドベクターを細胞に導入し、ゲノム DNA に組み込ませることで、ショートヘアピン RNA (shRNA) として細胞内に発現させることができる。

本研究室では、ランダムな配列を有する shRNA ライブラリーの作製手法を確立しており、このライブラリーには理論上全ての mRNA に対する shRNA が含まれる。この shRNA ライブラリーを導入した細胞の中から、目的の表現型を発現しているもののみを回収し、導入されている shRNA の塩基配列を解析することで、その表現型に関わる遺伝子とそれを抑制する shRNA を同定することができると考えられる。

がん細胞は、トリアシルグリセロール (TAG) などの中性脂質を、脂肪滴として細胞内に蓄積することが知られている。この脂肪滴は、がん細胞のエネルギー源の貯蓄や、酸化などの細胞ストレスの緩和、生体膜の恒常性の維持のために利用されてお

り、がん細胞の生存において、脂肪滴は重要な役割を果たしているといえる。したがって、がん細胞の脂肪滴蓄積を抑制する shRNA はがん治療に役立つ可能性がある。本研究では、そのような shRNA をライブラリーから見つけ出すために、がん細胞における脂肪滴蓄積、およびその抑制を評価する系の構築することを目的とした。

2. 方法

ヒト結腸がん細胞 HCT116 は、一価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸を添加した培地で培養し、脂肪滴の形成を誘導した。細胞内に形成される脂肪滴は、中性脂質を黄金色に蛍光染色することが可能な試薬であるナイルレッドで染色し、蛍光顕微鏡を用いた観察を行った。また、細い管の中で細胞を流しながら、1 細胞ごとの蛍光強度を測定することが可能な fluorescence-activated cell sorting (FACS) 解析も行った。TAG の生合成の最終段階に関わる酵素 DGAT1 を RNA 干渉する siDGAT1 は、エレクトロポレーション法によって細胞に導入し、脂肪滴の蓄積を抑制した HCT116 についても、蛍光顕微鏡観察と FACS 解析を行った。さらに、siDGAT1 によって RNA 干渉が起きていることを確認するために、DGAT1 の発現量を qPCR 法によって定量した。

3. 結果・考察

オレイン酸存在下で培養したHCT116細胞をナイルレッドで染色し、蛍光顕微鏡で観察した結果、黄金色の蛍光を発している脂肪滴が多数確認された(図1)。

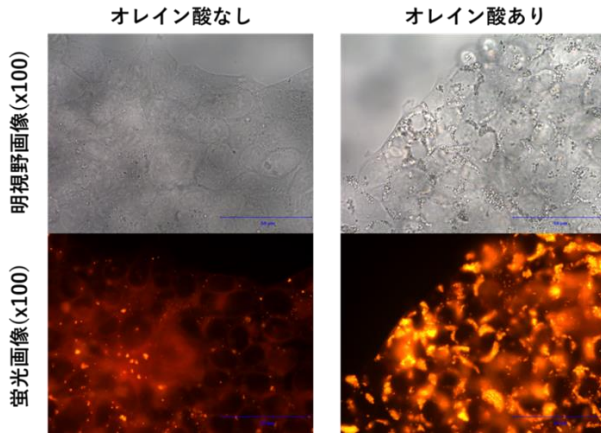


図1 オレイン酸添加の有無によるナイルレッド蛍光の違い

その蛍光強度はコントロールに比べて有意に高かった。FACS解析によっても、オレイン酸を取り込んだ細胞の蛍光強度はコントロールに比べて増加したことを確認することができた。次に、siDGAT1で処理した細胞は、期待通りに黄金色蛍光が有意に低下することを確認した(図2)。さらに、qPCRによって、DGAT1のmRNA量が減少していることも確認した。

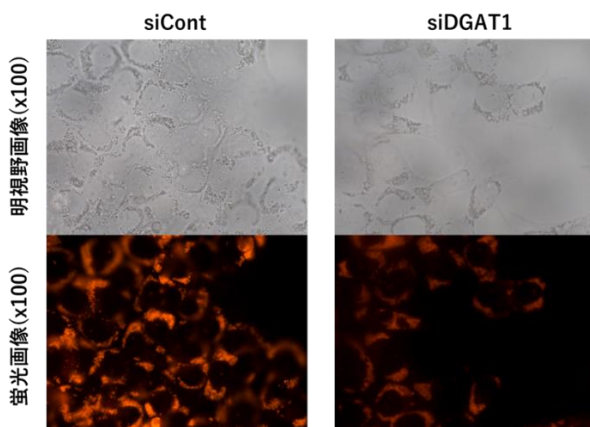


図2 siDGAT1を導入した細胞のナイルレッド蛍光

これらの結果から、RNAiによって脂肪滴の蓄積

が抑制されることが示された。よって、ヒト結腸がん細胞HCT116の脂肪滴蓄積を評価する系が出来たといえる。