

OI-05

HELMET 法を用いたマウス小腸上皮における DNA メチル化状態の解析

菱川 善隆, 宋 寧, 佐藤 陽子, 小路 武彦

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命医科学講座組織細胞生物学分野

器官或いは組織での細胞分化を決定する特異的な遺伝子発現制御機構を理解する為には、DNA のメチル化等のエピジェネティックな修飾状態の解析が不可欠である。一方で、細胞単位でのエピジェネティックな修飾状態を把握するためには組織細胞化学的方法論が有効であるが、特定の DNA 配列でのメチル化の有無の同定は不可能であった。そこで、我々は制限酵素 *Hpa* II と *Msp* I が同一の塩基配列 CCGG のメチル化修飾状態により作用が異なることに注目した新しい方法論、histo endonuclease-linked detection of methylation sites of DNA (HELMET) 法 (Ref) を開発し、今回、細胞分化・増殖活性が非常に高いマウス小腸上皮細胞での DNA メチル化状態の評価を行った。組織は 4%PFA/0.01M PBS 固定パラフィン包埋材料を用いた。HELMET 法では、組織切片上でターミナルトランスフェラーゼ (TdT) を用いてジデオキシヌクレオチド (ddNTP) を取り込ませ予め DNA の 3'-OH 切断部位への新たな塩基の付加をブロックした後に、メチル化 CCGG を切断できない *Hpa* II 処理を行った。その後、TdT 反応により脱メチル化 CCGG 切断部位を Biotin-16-dUTP で標識した。次に再度 ddNTP でブロック後、メチル化の有無に関わらず CCGG を切断する *Msp* I 処理を行い、TdT 反応によりメチル化 CCGG 切断部位を Dig-11-dUTP で標識し、蛍光免疫組織化学的にシグナルを視覚化した。その結果、小腸上皮での脱メチル化 CCGG 部位は陰窩、中間部、先端部共に同程度の発現が認められたのに対し、メチル化 CCGG 部位は絨毛先端部ほど強く認められた。更に小腸先端部のアポトーシス細胞では顕著な脱メチル化が生じていることが TUNEL 法と HELMET 法の二重染色により明らかとなった。以上より、小腸上皮の細胞分化制御に DNA メチル化状態が関与することが示唆されるとともに、細胞死誘導へのエピジェネティックな調節機構の関与も示唆された。

Ref) Koji et al. Histochem Cell Biol. (2008) 130: 917-925

OI-06

コレステロールによるマクロファージの機能制御：ACAT1 陽性特異オルガネラによるコレステロール代謝制御、異物貪食障害、C 型ニーマンピック病治療戦略

坂下 直実¹, 雷 小峰¹, 藤原 章雄¹, タュアン チャン², キャサリン チャン², 竹屋 元裕¹¹熊本大学大学院医学薬学研究部細胞病理学分野, ²ダートマス大学医学部生化学講座

旺盛な異物貪食と種々の生理活性物質産生により生体防御の要と位置づけられるマクロファージ (Mφ) は活発なコレステロール代謝を行う細胞でもある。事実、粥状動脈硬化病巣では大量のコレステロールエステルを蓄積した泡沫化 Mφ が様々な機能分子を産生して粥腫形成を制御している。われわれはコレステロールによる Mφ の細胞機能制御機構を明らかにするために、コレステロールのエステル化を触媒する酵素である acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) に着目して解析を行った。粥状動脈硬化病巣内の ACAT1 陽性細胞の大部分は Mφ であり、電顕的検討の結果、本来管状の小胞体膜に存在する ACAT1 の一部はコレステロール負荷に伴って小胞体由来の小胞構造にも出現していた。各種のオルガネラマーカーと共焦点レーザー顕微鏡ならびに細胞亜分画法を用いた検討の結果、Mφ の ACAT1 の一部はコレステロール負荷後にトランスゴルジネットワークや後期エンドゾーム/ライソゾーム (LE) マーカーを有する特異なオルガネラ (ACAT1-LE) に移動しており、このオルガネラは効率的なコレステロールのエステル化を担っていることが明らかになった。一方、ACAT1-LE を有する Mφ ではファゴゾームの成熟遅延が生じて異物貪食能が低下していた。C 型ニーマンピック病 (NPC) では細胞内コレステロール輸送蛋白の欠損により大量のコレステロールが LE に蓄積して細胞傷害を来すが、ACAT1-LE は NPC 病態においても細胞内に蓄積したコレステロールを効率的にエステル化していた。コレステロール負荷に伴う ACAT1-LE の出現は細胞内コレステロール代謝のみならず Mφ の細胞機能そのものを制御しており、その一方で大量の LE 内コレステロールをエステル化して細胞傷害を軽減する NPC の治療法開発にも繋がる重要な知見である。