

# ヒト癌由来細胞株を用いた Dipeptidase 1

## の局在、機能解析

福島県立医科大学大学院医学研究科

医科学専攻（解剖・組織学講座）

永井 千晴

# 要旨

Dipeptidase 1 (DPEP1) は、グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質で、腎臓や小腸の刷子縁に存在する亜鉛依存型メタロプロテアーゼである。近年、DPEP1 は、大腸癌の優れたマーカーであることが報告され注目されているが、大腸癌における DPEP1 の高発現と悪性度や予後の悪さとの相関に関しては過去の報告により結論が異なり、明確ではない。また、癌細胞特性における意義も不明である。したがって本研究では、ヒト癌由来細胞株を用いて DPEP1 の細胞内局在解析と機能解析を行った。

まず 5 種類の大腸癌由来細胞 (LoVo, RKO, HT29, SW480, CaCO2)、ヒト胃癌／大腸癌由来 HCC56 細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞及びヒト肺癌由来 A549 細胞における DPEP1 発現を Western blot 法により解析した。その結果、HCC56 細胞における DPEP1 の発現量が他の細胞株に比べて著しく高いことから、その後の解析には HCC56 細胞を用いた。DPEP1 を特異的に認識する抗体を用いて免疫蛍光法および包埋前免疫電顕法による局在解析を行った所、播種後 3 日後の培養細胞では DPEP1 は細胞膜上に点状に分布し、これらは GPI アンカー型タンパク質である CD59 と一致したが、flotillin や caveolin などのラフトマーカーとは一致しなかった。また、一部は微絨毛の基部に局在した。HCC56 細胞のヌードマウスへの異種移植組織およびヒト大腸癌組織を解析した結果、DPEP1 は主に細胞の apical ドメインに局在する他、一部の細胞ではその全周に分布した。

次に RNAi 法を用いて DPEP1 の発現抑制実験系を確立し、機能解析を行った。細胞培養系および異種移植実験において DPEP1 の発現抑制は細胞増殖能に有意な影響を及ぼさなかった。DPEP1 が細胞外グルタチオンの分解代謝に関与することに注目し、酸化ストレス耐性能への関与を調べた。DPEP1 の発現低下細胞にヒ酸水素二ナトリウム (AsV) を投与し、DNA の二重鎖切断をリン酸化 H2AX に対する抗体を用いて検出し、細胞核あたりの蛍光強度を定量比較した。その結果、正常細胞では影響が認められない AsV の濃度において、DPEP1 発現低下細胞株では AsV 添加群は対照群に比べ有意に DNA 損傷シグナルが増加した。

以上の結果より、DPEP1 は細胞膜上の GPI アンカー型タンパク質特異的なドメインおよび微絨毛ドメインに分布すること、DPEP1 の発現レベルは細胞増殖能には影響を与えないが、その高発現は酸化ストレスの軽減に寄与する可能性が示唆された。また、本研究に用いた HCC56 細胞は DPEP1 の機能を解析する良いモデル細胞であることが示された。

# 1. 序論

## 1.1 Dipeptidase 1 (DPEP1) の構造、分布、機能

Dipeptidase 1 (DPEP1; EC 3.4.13.11) は、1964 年に腎臓の尿細管上皮刷子縁に存在する酵素として精製され、renal dipeptidase, dehydropeptidase-I, microsomal dipeptidase とも呼ばれる (Campbell et al. 1966, Campbell 1970)。DPEP1 はシグナルペプチドをもつ分泌タンパク質で 411 アミノ酸からなり、61 kDa の分子量を有する (図 1 A)。また、ジスルフィド結合を介した二量体として存在し、グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型のタンパク質であることから (図 1 B; (Hooper et al. 1987))、細胞膜表面の脂質ラフトなど特定のマイクロドメインに局在する可能性が指摘されている (Mayor and Riezman 2004)。さらに、結晶解析における DPEP1 タンパク質の構造も明らかにされている (Nitanai et al. 2002)

DPEP1 は、齧歯類では心臓、腎臓、小腸、肺、精巣に分布し (Inamura et al. 1994)、小腸や腎臓では微絨毛に局在する (Kozak and Tate 1982, Adachi et al. 1992, Habib et al. 2003)。酵素学的には、亜鉛依存型のメタロプロテアーゼであり (Armstrong et al. 1974)、様々な種類のジペプチドを分解する (Campbell 1970)。また、病態生理に関連する特殊な機能として、腎臓におけるカルバペネム系抗生物質の  $\beta$  ラクタム環の加水分解、グルタチオン (GSH;  $\gamma$  glutamyl-cysteinyl-glycine) 代謝産物である cysteinyl-glycine の分解、及びシステイニルロイコトリエンであるロイコトリエン D4 (LTD4) の分解活性を持つことが報告されている (Kozak and Tate 1982, Kropp et al. 1982, Huber and Keppler 1987, Campbell et al. 1990)。薬物代謝の観点からは、カルバペネム系抗生物質は腎臓で速やかに分解代謝を受け、尿中濃度の低下をきたしてしまう。そこでこれを回避するために DPEP1 阻害剤としてシラスタチンが開発され (Kahan et al. 1983, Birnbaum et al. 1985)、配合剤として臨床応用されている。また、GSH の分解に際しては、細胞外の GSH が、まず  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) によって  $\gamma$ -glutamyl 基と cysteinyl-glycine に分解され、DPEP1 は後者を更に cysteine と glycine に分解する。これら分解産物は細胞内に輸送され、GSH 合成に利用されるが、ここで DPEP1 は特に不安定なアミノ酸である cysteine の供給に寄与すると考えられる (Estrela et al. 2006)。DPEP1 の生理学的意義を解明するために、Habib らは DPEP1 欠損マウスを作製、解析した (Habib et al. 1998)。

同マウスでは、上記 DPEP1 基質の分解活性が様々な程度で低下するものの、完全な活性欠如は認められず、生存率や生殖能などにも影響は認められなかった。また、この研究グループは同マウスを用いて DPEP1 (membrane-bound dipeptidase-1, MBD-1) の isoform として新たに MBD-2, MBD3 を発見した。この報告によれば、MBD-2 は LTD4 の分解活性をもつが cysteinyl-glycine は分解せず、MBD-3 は cysteinyl-glycine を分解するが MBD-1 の 2%程度の比活性であり、MBD-3 は LTD4 を分解しない (Habib et al. 2003)。

## 1.2 癌における DPEP1 の臨床病理学的意義

最近、DPEP1 は大腸癌マーカーとしての報告が相次いでいる。McIver らは、DNA マイクロアレイ解析と RT-PCR 法を用い、DPEP1 が大腸癌組織において高発現することを最初に報告した (McIver et al. 2004)。大腸癌における DPEP1 の mRNA およびタンパク質レベルの高発現は他のグループによっても確認され (Toiyama et al. 2011, Eisenach et al. 2013)、さらに卵巣癌に関しては、大腸癌からの転移性癌との鑑別に有用であることが報告された (Okamoto et al. 2011)。一方、大腸癌における DPEP1 高発現の臨床病理学的意義に関しては確固とした結論は得られていない。Toiyama らは、DPEP1 の高発現と組織学的悪性度、あるいは予後の悪さとの間に負の相関があると報告したが (Toiyama et al. 2011)、近年 Eisenach らは逆に正の相関があることを報告している (Eisenach et al. 2013)。また、大腸癌以外の癌種では、Wilm's 腫瘍、膵管腺癌、乳癌の非浸潤性小葉癌における DPEP1 発現は低く、膵管腺癌では発現の高い方が予後は良いと報告された (Austruy et al. 1993, Green et al. 2009, Zhang et al. 2012)。

このように、大腸癌における DPEP1 の高発現に議論の余地はないものの、その高発現が癌病態に与える影響については不明瞭なままである。また、mRNA やタンパク質の発現量についての報告はあるものの、癌細胞における細胞内局在についての報告はこれまでない。一方で DPEP1 の機能をその基質から考察した場合、細胞外 GSH の分解とシステイン取込みに寄与することで、細胞に酸化ストレス耐性能を付与している可能性が考えられる。細胞では常に活性酸素種が発生し、これを処理する機構が働いているが、この機構が破綻すると DNA やタンパク質等を損傷し細胞死を来す。最近、癌細胞には酸化ストレスに対する適応機構の存在が指摘され、癌治療標的の一つとして捉えられている



(Szatrowski and Nathan 1991, Kawanishi et al. 2006)。しかし、DPEP1 がその機構を担うことを示す細胞や個体レベルの研究はなされていない。そこで、本研究では大腸癌病態における DPEP1 の機能解析を目的として、まず、DPEP1 を高発現する細胞株を探索し、胃癌／大腸癌由来の HCC56 細胞をモデル細胞として選択した。そして同細胞を用いて DPEP1 の細胞内局在を行い、3 日培養における特徴的な局在分布を明らかにした。さらに DPEP1 発現低下細胞を用いて細胞増殖能、細胞移動・浸潤能、および酸化ストレス耐性能について解析を行った。

## 2. 材料と方法

### 2.1 抗体

各抗体の希釈倍率及び入手先は表 1 に示したとおりである。ラット抗 DPEP1 抗体は、所属研究室で作製されたものを使用した。作製方法を以下に示す。Gene gun による DNA 免疫法にて作製した。DNA によってコートされた金粒子を、Helios Gene Gun System (BIORAD) を用いて、ウィスターラット（日本クレア）の腹または背中 of 皮下に 400 p.s.i. の圧力で導入した。1 匹当たりの投与量は、1 回目の免疫は 5 発 (5 µg DNA)、2 回目以降は 3 発 (3 µg DNA) を導入した (1 µg / 発)。1 週間毎に 4 回免疫し、5 週間後に全採血を行った。さらに、小麦発現系を用いて作製したリコンビナントタンパクを用いてアフィニティー精製を行った。

### 2.2 細胞培養

ヒト胃癌／大腸癌由来細胞株 HCC56 細胞、5 種類のヒト大腸癌由来細胞株（LoVo, RKO, HT29, SW480, CaCO2）及びヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞、ヒト肺癌由来細胞株 A549 細胞、ヒト乳癌由来細胞株 MDA-MB-231 細胞について、10% FBS 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM；ナカライテスク）を培養液として用い、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

### 2.3 免疫組織蛍光法

試料としてヒト大腸癌組織アレイ（Shanghai Outdo Biotech Co. Ltd.）を用いた。キシレンによる脱パラフィンの後、エタノール（ナカライテスク）、食塩加リン酸緩衝液（PBS；pH 7.2）に置換した。抗原賦活化液としてイムノセイバー（日新 EM）を用い、液中に漬けて 98 °C で、20 分間のマイクロウェーブ処理を行った。冷却後、0.1% Triton X-100 / PBS で 15 分間、室温で透過処理を行った。洗浄後、5% 正常ヤギ血清と 0.1% Tween 20 / PBS で室温、20 分間、ブロッキング反応を行い、ウサギ抗 DPEP1 抗体（表 1）で 4 °C、2 日間、反応させた。次に、Alexa 488 標識二次抗体（表 1）を室温、1 時間で反応させ、共焦点レーザー顕微鏡（FV-1000, Olympus）を用いて観察を行った。

表 1 各種抗体名及び希釈倍率

一次抗体			
抗体名 (濃度)	会社名	希釈率	
ラット抗DPEP1抗体	DNA免疫法にて作製	WB	1:100
		IF	1:400
		EM	1:1000
ウサギ抗DPEP1抗体 (0.48 mg / ml)	SIGMA Aldrich	WB	1:500
		IHC	1:2000
		IF	1:200
マウス抗E-cadherin抗体 (250 µg / ml)	BD Biosciences	IHC	1:1000
		IF	1:1000
マウス抗ZO-1抗体 (250 µg / ml)	BD Biosciences	IHC	1:200
		IF	1:50
ウサギ抗c-Met抗体	Cell Signaling	IF	1:200
マウス抗CD59抗体 (1 mg / ml)	Abcam	IF	1:1000
マウス抗Flotillin-1抗体 (200 µg/ml)	Santa Cruz	IF	1:200
ウサギ抗Caveolin抗体 (250 µg / ml)	BD Biosciences	IF	1:500
ウサギ抗Ezrin抗体	Cell Signaling	IF	1:200
ウサギ抗p-H2AX抗体	Cell Signaling	IF	1:500
二次抗体			
抗体名 (濃度)	会社名	希釈率	
抗ラットIgG抗体 HRP標識	Dako	WB	1:2000
抗ウサギIgG抗体 HRP標識	Dako	WB	1:2000
ヒストファインシンブルステインマウスMAX-PO(R)	ニチレイバイオサイエンス	IHC	原液
Alexa 488 標識抗ラットIgG抗体 (2 mg / ml)	Invitrogen	IF	1:800
Alexa 488 標識抗ウサギIgG抗体 (2 mg / ml)	Invitrogen	IF	1:800
Alexa 594 標識抗ウサギIgG抗体 (2 mg / ml)	Invitrogen	IF	1:800
Alexa 594 標識抗マウスIgG抗体 (2 mg / ml)	Invitrogen	IF	1:800
1.4 nm Nanogold標識ヤギ抗ラットIgG	Jackson ImmunoResearch	EM	1:50

IgG : immunoglobulin G, HRP : horseradish peroxidase, WB : Western blot,  
IF : immunofluorescence, EM Electron microscope, IHC : immunohistochemistry

## 2.4 培養細胞における免疫蛍光法

24-well カルチャープレート（培養面積：1.9 cm<sup>2</sup>）にガラスカバースリップ（松浪硝子工業株式会社）を入れ、HCC56 細胞を 5×10<sup>5</sup> cell / well でまき、3 日間及び 7 あるいは 8 日間培養を行った。細胞は、4% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で 15 分間、室温で固定した。0.1% Triton X-100 / PBS で 30 分間、室温で透過処理を行った。洗浄後、2% 正常ヤギ血清と 0.1% Tween-20 / PBS で室温、20 分間、ブロッキングした後、一次抗体をそれぞれの希釈倍率（表 1）で 4 °C、16 から 24 時間で反応させた。洗浄後、Alexa 488 あるいは Alexa 594 標識二次抗体（表 1）を室温、1 時間で反応させ、共焦点レーザー顕微鏡（FV-1000, Olympus）を用いて観察した。画像取得の方法は Z 方向に 0.4 μm ずつ移動させながら 20 枚の光学的スライスを取得した。

## 2.5 免疫電子顕微鏡法

包埋前染色法を用いた。細胞を 4% ショ糖-4% パラフォルムアルデヒドを含む 0.1 M PB (pH 7.4) で 4 °C、20 分間、固定した。0.25% サポニン / 0.1 M PB 溶液で室温 30 分間、膜透過処理を行った後、ラット抗 DPEP1 抗体（表 1）を 4 °C、16 時間、次いで二次抗体を 4 °C、16 時間反応させた。1% グルタルアルデヒド / 0.1 M PB 溶液で、室温 10 分間、固定を行った後、銀増感（HQ Silver™ Enhancement Kit ; Nanoprobes）を行い、0.5% 四酸化オスミウム / 0.1 M PB 溶液で、氷上、90 分間の後固定を行った。EPON812 (TAAB) , dodecenyl succinic anhydride (DDSA , TAAB) , methyl nadic anhydride (MNA, TAAB) , dimethyl aminomethyl phenol (DNP30 , TAAB) を配合してエポン樹脂を作製し、包埋、重合した。ウルトラミクロトームを用いて 60 nm の超薄切片を作製し、2% ウラニル酢酸溶液と 0.25% クエン酸鉛水溶液を用いて電子染色を行った後、電子顕微鏡（JEM1200EX, JEOL）で観察した。

## 2.6 RNA 干渉法（RNAi）

6-well カルチャープレート（培養面積：9.6 cm<sup>2</sup>）に 5×10<sup>5</sup> cell / well の HCC56 細胞をまいた。24 時間後、Opti-MEM 200 μl に 50 μM DPEP1 siRNA オリゴヌクレオチド（表

2) を 1.6  $\mu$ l 加えた混合液、そして Opti-MEM 200  $\mu$ l に Lipofectamine<sup>TM</sup>RNAiMAX (Invitrogen) を 4  $\mu$ l 加えた混合液を等量ずつよく混ぜ、室温で 20 分間静置し、各ウェルの細胞に全量 400  $\mu$ l 添加した (最終濃度 0.028  $\mu$ M)。添加後、細胞を 1 から 5 日間培養した。

表 2 DPEP1 siRNA 用オリゴヌクレオチド

DPEP1, siRNA ID	メーカー	製品名	sense	antisense
DPEP1- si #1	Ambion	DPEP1 Silencer Select Pre- designed siRNA	GCGACACCCAGAACAAAGAtt	UCUUUGUUCUGGGUGUCGag
DPEP1- si #2	Thermo Scientific	ON-TARGET plus SMARTpool Human DPEP1 siRNA 4sets of oligonucleotides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GGAUGUACCCGGAGACUU</li> <li>• CGACUUGGCUCACGUGUCU</li> <li>• GAACAGGCCAGCAACCUCA</li> <li>• GAGGACGUCUCCAAGUAUC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>AAGUCUCCGGGUACAUA</li> <li>AGACACGUGAGCCAAGUCG</li> <li>UGAAUUGCUGGCCUGUUC</li> <li>GAUACUUGGAGACGUCCUC</li> </ul>
si ctrl	Ambion	Silencer Negative Control #1 siRNA (AM4611)	配列未公表	

## 2.7 過剰発現実験

6-well プレートに HCC56 細胞 ( $5 \times 10^5$  cell / well) をまき、24 時間後、Opti-MEM 100  $\mu$ l に DPEP1 cDNA を含む発現ベクター、あるいはコントロールとして、GFP 遺伝子を含む発現ベクターを 2  $\mu$ g、及び FugeneHD (Promega) 6  $\mu$ l を混和し、室温で 15 分間静置した。各ウェルに添加後、48 時間培養を行った。

## 2.8 SDS-PAGE 及び Western blotting

培養細胞を 1% プロテアーゼインヒビター (Roche) と 1% フォスファターゼインヒビター (SIGMA Aldrich) を含む 1% Triton X-100 / PBS を用いて溶解し、15000 rpm で 10 分間、遠心分離し、上清を回収した。次に、BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific) を用いて、抽出液の濃度を測定した。タンパク質 10 mg /ml になるように 5 $\times$  サンプルバッファー (100 mM Tris-HCl, 1% グリセロール, 0.1% ブロモフェノールブルー

ー [BPB]) を加え、混和し、90 °C で 10 分間煮沸した。その後、10% ポリアクリルアミドゲル (Wako) を用いて、非還元状態で電気泳動を行った (10 µg / lane)。その後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (MILLIPORE) に転写した。PVDF 膜を洗浄した後、10% スキムミルク / 0.1% Tween20 in PBS で 30 分間、室温でブロッキングし、その後、ラット抗 DPEP1 抗体 (表 1)、ウサギ抗 DPEP1 抗体 (表 1) を室温で 1 時間反応させ、0.1% Tween20 in PBS で洗浄後、適切な二次抗体 (表 1) を室温で 30 分間反応させた。洗浄した後、化学発光試薬 (ECL Prime, GE ヘルスケア・ジャパン) を用いて 3 分間室温で発光反応を行い、そのシグナルを LAS-4000 (GE ヘルスケア・ジャパン) で検出した。

## 2.9 細胞移動能及び浸潤能評価

細胞の移動能の解析には、有孔 (pore size 8 µm) の 24-well インサートチャンバー (BD Biosciences) を用いて、チャンバー上部に無血清 DMEM 培地で調整した HCC56 細胞あるいは、MDA-MB-231 細胞を加え、ウェル底部に 10% FBS を含む DMEM 培地を加え、37 °C で 24 時間インキュベーションした。その後、チャンバー上部の細胞を綿棒で取り除き、4% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で室温、15 分間、固定した。メンブレン底部に移動した細胞を、トルイジンブルー染色し、観察を行った。浸潤能の解析は、有孔 (pore size 8 µm) の 24-well マトリゲルインベーションチャンバー (BD Biosciences) を用いたことを除いて、上記、移動能の解析と同様の方法で行った。

## 2.10 増殖能評価

上記 RNAi 実験と同様の操作を行い、細胞を 48 時間培養した。0.5 g / l トリプシン / PBS で細胞をはがし、96-well カルチャープレート (培養面積 34 mm<sup>2</sup>) に 5×10<sup>5</sup> cell / well で各ウェルに 100 µl ずつまき直し、培養 1 日、3 日、5 日間後の細胞増殖の程度を、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を用いて調べた。Cell Counting Kit-8 溶液を各ウェルに 10 µl ずつ添加し、4 時間、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養し、その後、マイクロプレートリーダーを用いて、吸光度 (490 nm) を測定した。

## 2.11 酸化ストレス誘導実験と DNA 損傷の評価

24-well カルチャープレートにガラスカバースリップを入れ、HCC56 細胞を  $5 \times 10^5$  cell / well で播種した。24 時間後に各ウェルに Opti-MEM 50  $\mu$ l に表 2 に記載した 50  $\mu$ M siRNA オリゴヌクレオチド (DPEP1-si #1, DPEP1-si #2, or si ctrl) を 0.4  $\mu$ l 加えた混合液、そして Opti-MEM 50  $\mu$ l に Lipofectamine<sup>TM</sup>RNAiMAX (Invitrogen) を 1  $\mu$ l 加えた混合液を等量ずつよく混ぜ、室温で 20 分間静置し、各ウェルの細胞に全量 100  $\mu$ l 添加し、3 日間培養した。PBS あるいはヒ酸水素二ナトリウム七水和物水溶液 (AsV) を最終濃度 400  $\mu$ M になるように加え、20 時間培養した。細胞を 4% パラフォルムアルデヒドを含む PBS で室温、15 分間、固定した。抗抗 Phospho-Histone H2AX (p-H2AX) 抗体を表 1 に示す濃度で免疫反応を行い、2 次抗体として Alexa594 標識ウサギ IgG 抗体を用いた。さらに Hoechst を用いて核染を行った。落射型蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) で観察し、1 カバースリップあたりランダムに 5 視野の画像 (328  $\mu$ m x 432  $\mu$ m) を撮影し、p-H2AX と Hoechst 画像をそれぞれ Tagged Image File Format (TIFF) 画像として保存した。定量解析するために HISTO QUEST TISSUE ANALYSIS SOFTWARE (TISSUE Gnostics) を用い、Hoechst で染色された細胞核あたりの p-H2AX の蛍光強度を定量化した。統計学的検定はウェルチの t 検定を用いた。また、同様に固定した細胞を抗 4-Hydroxynonenal (4-HNE) 抗体 (Alpha Diagnostic Intl inc, 1: 500) を用いて免疫染色を行い、2 次抗体として Alexa594 標識ウサギ IgG 抗体を用い、Hoechst を用いて核染を行った。落射型蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) で観察した。

## 2.12 shRNA を用いた安定発現低下細胞株 HCC56 細胞の作製

本実験は、組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。レンチウイルスベクターとして、MISSION pLKO.1-puro Control Vector (SIGMA Aldrich) を用い、AgeI と EcoRI で 37 °C、一晩、消化した。挿入断片作製のオリゴヌクレオチドとして以下を用いた。

<センス鎖>

5'-ccggCTGCGACACCCAGAACAAGActcgagTCTTTGTTCTGGGTGTCGCAGTTTTTg - 3'

<アンチセンス鎖>

5'-aattcAAAAACTGCGACACCCAGAACAAAGAActcgagTCTTTGTTCTGGGTGTCGCAG-3'

DPEP1の標的塩基配列は257から278番目（大文字部分）、アニール部位は下線部分に相当する。センス鎖オリゴヌクレオチド4  $\mu$ lとアンチセンス鎖オリゴヌクレオチド4  $\mu$ l を等量混ぜ、90  $^{\circ}$ C 5 min, 37  $^{\circ}$ C 10 minの条件で、アニーリング反応を行った。この反応生成物を挿入断片として用いた。挿入断片と酵素処理したベクター、および2 $\times$  mighty mix（タカラバイオ）を混ぜ、16  $^{\circ}$ C 30 分ライゲーション反応を行い、その後、大腸菌コンピテントセル（ECOS<sup>TM</sup> Competent E. coli JM109）（ニッポン・ジーン）にトランスフォーメーションを行い、100  $\mu$ g / ml カルベニシリン含有のLuria-Bertani (LB) 寒天培地に接種し、37  $^{\circ}$ Cで一晩培養した。培地に形成された菌コロニーをピックアップし、100  $\mu$ g / ml カルベニシリン含有のLB 液体培地で一晩振盪培養した。菌を回収後、構築されたベクターDNAを精製し、EcoRIとMluIにより制限酵素処理を行って挿入断片の有無を確認すると共に、接合部の塩基配列をシーケンサーで確認した。Opti-MEM 150  $\mu$ lに対してFugeneHD 7.5  $\mu$ l、および gag, pol構造遺伝子の発現ベクター（4.1R）0.75  $\mu$ g、envelope遺伝子の発現ベクター（VSVG）0.25  $\mu$ g、Rev, Tatアクセサリ遺伝子の発現ベクター（RTR2）0.25  $\mu$ g、およびpLKO 1.25  $\mu$ gあるいはpLKO-DPEP1 1.25  $\mu$ gを混和し、HEK293細胞に添加後、2 日間、37  $^{\circ}$ Cで培養した。2 日後に上清を回収しウイルス液とした。ポリブレン10  $\mu$ g / ml を含むDMEMとウイルス液を50  $\mu$ lずつ混ぜ、HCC56細胞（10 cm dish 1 枚相当）に加えた。翌日、新たな培地に交換して24時間培養後、puromycineを最終濃度 1.4  $\mu$ g / ml になるように加え薬剤選択を開始した。10日後に生存細胞を回収し、クローニングを行わずに培養を維持した。

## 2.13 ヒト胃癌／大腸癌由来細胞株を用いた異種移植実験

本実験は、動物実験委員会の承認を得て行った。安定的に DPEP1 を発現低下させた HCC56 細胞とベクターを遺伝子導入した HCC56 細胞を培養した。0.5 g / l トリプシン / PBS で細胞を剥離し、遠心分離機で細胞を沈殿回収した。PBS 5 ml で一回洗浄し、細胞数を計測した。1.5 $\times$ 10<sup>7</sup> cell / ml に調整した細胞懸濁液 0.1 ml を雌ヌードマウス（4 週齢, BALB / cA nu / nu）の臀部に計 2 ヶ所注射し、6 週間飼育した。1 週間ごとに腫瘍径を計測し、以下に示す公式を用いて腫瘍容積を算出した。

$$\text{Volume} = LW^2 \pi / 6 \quad (\text{L: 長径, W: 短径})$$



6 週間後、麻酔下に腫瘍組織を摘出し、4% パラフォルムアルデヒド-4% スクロース / PB (pH 7.4) に浸漬固定した。組織ブロックをパラフィン包埋し、3  $\mu$ m 厚のパラフィン切片を作製した。上記の免疫組織蛍光法の手法に従い、洗浄後、5% 正常ヤギ血清と 0.1% Tween 20 / PBS で室温、20 分間、ブロッキングをした後、ウサギ抗 DPEP1 抗体とマウス抗 E-cadherin 抗体あるいはマウス抗 ZO-1 抗体 (表 1) で 4  $^{\circ}$ C、2 日間、反応させた。次に、Alexa 488 あるいは Alexa 594 標識二次抗体 (表 1) を室温、1 時間で反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) を用いて観察を行った。

#### 2.14 グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合型 DPEP1<sup>263-388</sup> タンパク質精製

本実験は、組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。ベクターとして pGEX-6P1 (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いた。pGEX-6P1 を EcoRI と SalI で 37  $^{\circ}$ C、4 時間、消化し、イソプロパノール沈殿を行った。DPEP1 の cDNA 挿入断片を作製する目的で以下のプライマー配列を用いた。

forward primer : 5' - CCCCTGGGATCCCCGGAATTCgtgatggtgaacttctacaac - 3'

reverse primer ① : 5' - GATGCGGCCGCTCGAGTCGACTCAggaagccccagaggagta - 3'

reverse primer ② : 5' - GATGCGGCCGCTCGAGTCGACcacaggagagacagagag - 3'

DPEP1 の cDNA (60 ng /  $\mu$ l) を鋳型として、forward primer、reverse primer の①あるいは②、及び Prime STAR MAX (タカラバイオ) を混和し、PCR 反応を行った。PCR 産物を電気泳動し、目的とする cDNA 挿入断片の切り出し、精製した。挿入断片とベクターを 5 $\times$  infusion Mix (Clontech Laboratories, Inc.) と混和し、37  $^{\circ}$ C、15 分間、50  $^{\circ}$ C、15 分間の条件で In-Fusion 反応反応を行った。その後、大腸菌コンピテントセルにトランスフォーメーションを行い、100  $\mu$ g / ml カルベニシリン含有の LB 液体培地で一晚、インキュベートした。菌を回収し、その後、大腸菌コンピテントセルにトランスフォーメーションを行い、100  $\mu$ g / ml カルベニシリン含有の LB 液体培地で一晚、インキュベートした。菌を回収し、その後、miniprep を行い、回収した DNA を EcoRI と SalI で制限酵素処理をした。1 / 50 に希釈した DNA と大腸菌コンピテントセルにトランスフォーメ

ーションを行い、100 µg / ml カルベニシリン含有の LB 寒天培地にプレーティングし、37 °Cで一晩インキュベートした。コロニーをピックアップし、10 ml LB 培地に接種し、37 °Cで一晩培養した。30 µl の菌液を新たな LB 培地 3 ml に加え、37 °C、3 時間培養した。ここにイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を 0.5 mM になるように加え、さらに 37 °C、6 時間培養後、菌体を回収した。遠心回収した菌体に 0.5% TritonX-100 / PBS / 0.1% プロテアーゼ阻害剤を加え、超音波破碎を行った。15000rpm、10 分間、遠心分離機で可溶性画分と不溶性画分に分け、それぞれの画分の抽出液を作製し、電気泳動を行い、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行った。ここで、精製した GST-DPEP1 タンパク質 (GST-DPEP1<sup>263-388</sup> および GST-DPEP1<sup>263-411</sup>) 可溶性画分に存在するかどうかを確認した。その後、同様の操作で、1.5 □l の菌液を新たな LB 培地 150 ml に加えた三角フラスコを 3 本と、3 □l の菌液を新たな LB 培地 300 ml に加えた三角フラスコを 37 °C、6 時間、大量培養を行い、菌体を回収した。回収した菌体に 1% TritonX-100 / PBS / プロテアーゼ阻害剤を 1 ml 加え、超音波破碎を行い、遠心分離した。上清 1 ml に GSH・セファロース (50% の PBS 懸濁液) (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を 250 µl 加え、4 °Cで 5 時間、試験管を回転させながら混和した。遠心後に上清を吸引廃棄し、セファロースを PBS で洗浄し、マイクロバイオスピンクロマトグラフィー用カラム (BioRad) にうつした。セファロースを順に、PBS、0.5% TritonX-100、TENGN 緩衝液 (50 mM Tris-HCl [pH 8.0] , 1 mM EDTA, 0.1% TritonX-100) で洗浄し、溶出液 20 mM 還元型グルタチオンを含む TENGN 緩衝液で回収した。精製したタンパク質濃度を見積るために、溶出液 1、0.5、0.25 µl、及び正常ウシ血清アルブミン 0.25、0.5、1、2 µg を電気泳動し CBB 染色を行った。

抗ウサギ DPEP1 抗体 (1 : 200) と TENGN 緩衝液、および GST-DPEP1<sup>263-388</sup> あるいはコントロールとして GST を 4 µg を混和し、4 °C、一晩、反応させた。同液を上記細胞およびヒト大腸癌組織アレイにおける免疫蛍光法に使用した。

### 3. 結果

#### 3.1 DPEP1 解析に有用なヒト由来細胞株の選択

細胞レベルで DPEP1 の局在様式と機能を解析するために、DPEP1 を高発現する細胞株を探索した。5 種類のヒト大腸癌細胞株 (LoVo, RKO, HT29, SW480, CaCO2)、ヒト胃癌／大腸癌由来 HCC56 細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞及びヒト肺癌由来 A549 細胞の DPEP1 発現量を Western blot 解析で比較したところ、HCC56 細胞において 100 kDa 付近に幅の広い強いバンドとして検出された。CaCO2 細胞、HT29 細胞においては非常に弱いシグナルが検出され、その他の細胞ではほとんど検出されなかった (図 2A)。したがって本研究では、以後の解析を DPEP1 高発現株である HCC56 細胞を用いて行った。HCC56 細胞の形態的特徴を調べるために、HCC56 細胞と上皮解析モデルとして良く用いられる CaCO2 細胞について、3 日間及び 8 日間培養した後の細胞形態を位相差顕微鏡で解析した。CaCO2 細胞は、3 日間で敷石状を呈し、この形態を維持したまま増殖するのに対し、HCC56 細胞は、3 日間でドーム状の細胞塊をつくり、その後 8 日間まで細胞塊の間を埋めるようにシート状に増殖した (図 2B)。

#### 3.2 抗 DPEP1 抗体の評価と HCC56 細胞における分布

本実験では市販のウサギ抗 DPEP1 抗体、及び所属研究室で作製したラット抗 DPEP1 抗体を用いた。まず、これら抗体が免疫蛍光法を用いた形態観察に使用可能かどうかについて評価した。2 種類の siRNA を用いて HCC56 細胞における DPEP1 発現を低下させたところ、両抗体共に Western blot 法では DPEP1 を示すバンド濃度が減少し (図 3A)、免疫蛍光法でも明らかなシグナル低下が認められた (図 3B)。一方、DPEP1 を一過性に過剰発現させると、Western blot 法で DPEP1 の増加が検出できた (図 3A)。ラット抗 DPEP1 抗体とウサギ抗 DPEP1 抗体によるシグナルが一致するかどうかを確認するために、3 日間培養した HCC56 細胞で二重免疫蛍光法を行った。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて XY 及び XZ 断面を高解像度で観察すると、両抗体により DPEP1 は細胞膜上の点状シグナルあるいはその集合体として検出され、それらの多くは共局在を示したが、一部はラット抗体でのみ認識された (図 3C)。以上より、ラット抗 DPEP1 抗体は、培養細胞を用いた免疫蛍光法において、ウサギ抗 DPEP1 抗体では認識し難い DPEP1 の局在

解析を可能にするものであることが示され、以後培養細胞における免疫蛍光法にはラット抗 DPEP1 抗体を用いることとした。

### 3.3 ヒト大腸癌組織における DPEP1 の局在解析

次に、パラフィン包埋切片を用いた免疫組織蛍光法に使用可能かどうかについて、エピトープが明らかなウサギ抗 DPEP1 抗体についてのみ検討した。本検討は過去に報告がないために重要と考えた。具体的には、エピトープを含む DPEP1 を GST 融合リコンビナントタンパク質として精製し、吸収実験を行った。HCC56 細胞の異種移植組織をパラフィン包埋し、その切片を用いて免疫組織蛍光法を行ったところ、GST タンパク質で吸収した抗体では染色性は認められたものの、GST に 263-388 番目のアミノ酸を含む DPEP1 (DPEP1<sup>263-388</sup>) を融合したタンパク質で吸収した抗体では、染色性が顕著に低下した (図 4A-C)。以上の結果から、ウサギ抗 DPEP1 抗体がパラフィン包埋切片で特異的にヒト DPEP1 を認識することが示された。

上記抗体評価の結果を受けて、ヒト大腸癌組織アレイを用いて免疫組織蛍光法を行った。癌組織近傍の正常部位ではほとんど染色性はみとめられなかったが (図 4D)、30 症例中 22 症例の癌組織において DPEP1 の強い染色が認められた (図 4E, F)。これは過去の報告と一致する (Toiyama et al. 2011, Eisenach et al. 2013)。上皮の極性が保たれている部位では、apical 側の細胞膜に強い染色が認められ、一部の組織では側面の細胞膜にも観察された (図 4E)。また、上皮構造を欠いた小型細胞集団からなる部位では細胞膜全周性に観察された (図 4F)。

### 3.4 培養期間による DPEP1 局在の変化と陽性ドメインの同定

次に、培養期間による DPEP1 局在を解析するために、細胞塊形成段階 (3 日間) と極性形成段階 (7 日間) の 2 時点において、Basolateral ドメインマーカーである E-cadherin (図 5A) 及び c-Met (図 5B)、そして tight junction のマーカーである ZO-1 (図 5C) との二重染色を行った。その結果、培養 3 日間において DPEP1 は apical 面だけでなく basolateral 面にも点状シグナルとして局在したが、培養 7 日間になるとほとんどが apical

表面に観察された。以上の結果は、HCC56 細胞が大腸癌組織における多様な DPEP1 局在を再現しうる細胞株であることを示唆する。

次に、培養 3 日間で観察された DPEP1 の点状シグナルに注目し、この膜ドメインの解析を行った。GPI アンカー型タンパクである CD59 に対する抗体を用いて二重免疫蛍光法を行ったところ、両者とも多くの点状構造で共局在を示し、一部は、CD59 単独あるいは DPEP1 単独のシグナルも観察された (図 6A)。一方、一般的なラフトマーカーとされる flotillin-1 と caveolin との二重蛍光法を行ったところ、両者ともに、まれに DPEP1 と部分的な共局在を示したが、ほとんどのシグナルは共局在しなかった (図 6B, C)。また、微絨毛マーカーとして知られる Ezrin との二重免疫蛍光法を行った結果、Ezrin シグナルの直下に DPEP1 のシグナルが観察された (図 6D)。さらに、電子顕微鏡レベルでの局在を解析する目的で、3 日間培養した HCC56 細胞を包埋前免疫電子顕微鏡法により解析した。DPEP1 を示す金コロイドは、微絨毛を有する部位では微絨毛の基部に集積する傾向が認められた (図 7A, B)。また、培地あるいは隣接細胞に面した細胞表面の特定部位に集積していた (図 7C, D)。

### 3.5 DPEP1 発現が細胞増殖能に及ぼす影響

DPEP1 の機能解析を行うために、HCC56 細胞における RNAi 実験系を確立した。2 種類の siRNA あるいは対照 siRNA を投与して、1、3、5、7 日間培養後の DPEP1 発現量を Western blot 法により解析したところ、これらの培養期間は発現低下が維持されていることを確認した (図 8A)。細胞増殖率を解析したところ、DPEP1 の発現低下細胞と対照細胞の間に有意な差は認められなかった (図 8B)。さらに、shRNA を用いて DPEP1 の安定発現低下細胞株を 2 種類作製した。Western blot 法により解析したところ、それぞれ対照細胞株の約 46% 及び 78% にまで DPEP1 の発現が低下していた (図 8C)。これら細胞をヌードマウスに移植し、その増大率を測定した結果、容積及び重さと共に、対照細胞と DPEP1 発現低下細胞との間に有意さが認められなかった (図 8D)。

### 3.6 DPEP1 発現が異種移植組織の形態に与える影響

DPEP1 発現の差が、癌組織の組織構築に変化を来すのかどうかを検討するために、2 種類の DPEP1 安定発現低下細胞の異種移植組織を用いて形態学的評価を行った。対照細胞である H56-pLKO の異種移植組織に比べ、DPEP1 発現低下細胞である H56-DPEP1-KD1 および H56-DPEP1-KD2 の異種移植組織では、DPEP1 の発現が顕著に低下することを確認した。その上で E-cadherin または ZO-1 のような極性形成のマーカーには大きな変化は観察されなかった (図 9A-F)。この結果は、抗体の特異性を再確認すると共に、DPEP1 の発現低下は細胞の極性形成に大きな影響を与えないことを示唆する。

### 3.7 細胞の移動能評価

トランスウェルを用いて細胞の遊走能及び浸潤能について評価を試みた。本実験では乳癌由来 MDA-MB-231 細胞をポジティブコントロールとして比較したところ、24 時間内では HCC56 細胞はほとんど移動せず (図 10A-E)、評価不能であった。

### 3.8 DPEP1 の酸化ストレス耐性に与える影響

最後に、DPEP1 は cysteinyl-glycine を分解することで酸化ストレス耐性能の付与に係ることが示唆されるため、DPEP1 発現低下細胞株を用いて酸化ストレス耐性能を解析した。400  $\mu$ M ヒ酸水素二ナトリウム七水和物水溶液 (AsV) を 20 時間投与し、酸化物質の一つである 4-Hydroxynonenal (4-HNE) を免疫蛍光法で、また DNA の 2 重鎖切断を抗リン酸化 H2AX 抗体を用いた免疫蛍光法により検出した。4-HNE 量は AsV 投与群で明らかに増加し、酸化ストレスが付加されていることを確認した (図 11B)。また、そのシグナルは対照細胞よりも 2 種類の DPEP1 発現細胞のほうがやや強い傾向を示した。次にリン酸化 H2AX PBS 投与群の中で対照細胞と 2 種類の DPEP1 発現低下細胞間で有意差はなく、また、ここで用いた AsV 濃度は、対照細胞ではリン酸化 H2AX の差として認識できない程度であった。しかし 2 種類の DPEP1 発現低下細胞株では、AsV 添加群は PBS 添加群より有意にリン酸化 H2AX のシグナルが増加した (図 11C, D)。

## 4. 考察

### 4.1 モデル細胞としての HCC56 細胞

本研究では、DPEP1 の機能解析を進める上で、まず DPEP1 の高発現細胞株を探索した。調査した細胞株の中では HCC56 細胞のみが、Western blot 法および免疫蛍光法で十分に検出シグナルが得られた (図 2A)。同細胞の増殖様式は培養初期にドーム状の細胞塊を呈することが特徴的であり、CaCO2 とは大きく異なる。しかし、最終的には極性を有する上皮形態を示し、apical domain に DPEP1 の局在が見られた。また、HCC56 細胞の異種移植組織の解析では、腺管構造を示すこと、apical domain に強い DPEP1 シグナルを有し、部位により basolateral domain あるいは細胞全周にシグナルが認められた (図 4A-C)。重要なことに、これら特徴は実際のヒト大腸癌の G2-G3 低分化型腺癌と類似した (図 4F) ことから、同細胞株は DPEP1 機能の解析に適することが示された。

### 4.2 DPEP1 の細胞内局在

過去の報告では、DNA マイクロアレイ解析のみならず免疫組織学的解析によっても DPEP1 が大腸癌のマーカーであることが示されている。本研究では市販の組織アレイを用いることで同様の結果を得た (図 4D-F)。しかし、細胞レベルでの局在解析は十分になされていない。今回は、3 日間培養した HCC56 細胞、すなわち上皮形成が不完全な状態の培養細胞を用いて解析した。興味あることに、DPEP1 は細胞膜上に一様に局在するわけではなく、その多くは点状シグナルとして観察された。このドメインの同定を試みた所、他の GPI アンカー型タンパク質 CD59 と共局在を示し、flotillin-1 や caveolin などのラフトマーカーとは異なる局在を示したことから、GPI アンカー型タンパク質に特異的なマイクロドメインに局在すると考えられる。このドメインの形成意義は不明であるが、DPEP1 の集積による酵素活性の調節機構、あるいは同ドメインに集積する他の膜貫通タンパク質などを介して細胞内シグナル伝達に関係する可能性などが考えられる (Mayor and Riezman 2004)。また、微絨毛マーカーである Ezrin との二重染色および免疫電顕観察の結果より微絨毛の基部に局在することが示された。この局在の意義も不明であるが、ジペプチドの消化・吸収に関係するのかもしれない。

一方、7日間培養すると多くの DPEP1 は上皮のアピカルドメインに局在するようになった。これは DPEP1 が尿細管や小腸上皮の刷子縁に局在するという過去の報告に一致する (Kozak and Tate 1982, Adachi et al. 1992, Habib et al. 2003)。DPEP1 発現低下細胞の異種移植組織でも上皮の極性形成に大きな影響は見られなかったことから (図 9)、DPEP1 が上皮形成そのものに関与する可能性は低いと考えられる。おそらく上皮形成の過程で、小胞輸送機構などの関与により DPEP1 のアピカル面への局在化が進行したと思われるがその詳細は不明である。しかし、少なくともこの現象は癌細胞の分化度を図る指標になる可能性があり、今後実際の病理組織を用いた解析に有用な知見と考えられる。

興味あることに、HCC56 細胞の 3 日間培養細胞において DPEP1 陽性ドメインの一部はラット抗体でのみ認識された。免疫に用いた抗原の情報から、ウサギ抗体が認識するエピトープはラット抗体より少ないと考えられる。このことは、DPEP1 の分子構造が局在するドメインにより異なることを示唆する。この差異が機能を反映するかどうかは今後、研究進める必要があろう。いずれにせよ、本研究により DPEP1 の GPI アンカー型タンパク質としての局在様式が明らかになった。今後、本知見は DPEP1 陽性ドメインの癌細胞あるいは正常吸収上皮細胞における機能解析に寄与できるものと考えている。

#### 4.3 癌細胞特性に関する DPEP1 の機能

本研究では DPEP1 の細胞増殖能に与える影響を調べるために、DPEP1 の発現低下細胞を用いて、細胞培養系のみならず、新たに異種移植実験系を用いて解析した。しかし、有意な差は得られなかった。これは過去の報告と一致するものであり、DPEP1 の発現と細胞増殖能との相関は低い事を示す。一方、同細胞を用いた移動能、浸潤能の評価については、HCC56 細胞が移動能に極めて乏しい細胞であるために困難であった。過去の報告で、DPEP1 を低発現させた SW480 細胞はマトリゲルへの浸潤能が有意に低下することが示された (Toiyama et al. 2011)。その機構として DPEP1 の細胞外基質の分解によるものと論じられているが、この点は注意が必要である。癌細胞はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) などの働きでコラーゲンなどの細胞外基質を溶かして浸潤する (Liotta et al. 1980, Sato et al. 1994)。しかし、DPEP1 はジペプチドの分解活性は有するものの、トリペプチド以上のオリゴペプチドの分解活性が低いことが知られている



(Campbell et al. 1966) 。したがって DPEP1 低発現による浸潤能の低下に関しては、細胞外基質の直接分解以外の機構を想定した研究が必要であろう。

さらに、本研究における機能解析について、仮説を立てた。これまでに、DPEP1 が細胞外 GSH の分解代謝に関与する報告があることから、DPEP1 発現と酸化ストレス耐性能との関係性を探り、DPEP1 の GSH 分解活性が癌細胞特性に寄与する可能性を考え、AsV 投与による酸化ストレス負荷後の DNA 損傷の程度を調べた。その結果、DPEP1 発現低下により DNA 損傷の程度が有意に高かった。このことは、DPEP1 の発現量が酸化ストレス耐性能に寄与することを示唆する。私達が知る限り、細胞外 GSH の代謝に関わる一つの酵素量の変化で細胞の酸化ストレス耐性能に影響を与える報告は、本研究が初めてである。上述したが、上皮が形成される以前の HCC56 細胞とその異種移植組織、および実際の大腸癌組織では全周性に DPEP1 が局在する細胞集団が認められたことから、細胞極性を失った細胞では酸化ストレス耐性が高いことが予想される。この観点では、上皮極性を有し apical ドメイン優位に DPEP1 が局在する場合の DPEP1 の機能は癌病態における意義とは異なるかもしれない。DPEP1 特異的膜ドメインと酸化ストレス耐性能に関しては、今後、GGT の局在様式やその発現レベルと酸化ストレス耐性能との関連も合わせて解析する必要があるだろう。

#### 4.4 DPEP1 の発現と癌の悪性度、予後との関係

本研究結果から、DPEP1 の発現レベルと大腸癌の悪性度や予後との関係を考察したい。Toiyama ら (Toiyama et al. 2011) は、DPEP1 高発現と悪性度、予後の悪さは負の相関があるとし、Eisenach ら (Eisenach et al. 2013) は正の相関があることを報告した。DPEP1 発現が酸化ストレス耐性に寄与するのであれば、発現が高いほど癌細胞は酸化ストレスに耐性を示し、生存する可能性が高まると考えられる。しかし、酸化ストレスに耐性であるということはその後の遺伝子変異の確率が低下することを示し、悪性化には寄与しないとも考えられる。また、上皮形態を保持している細胞集団では、DPEP1 は apical ドメインに強く局在しており、必ずしも悪性化、すなわち上皮間葉転換や浸潤と相関するとは考えにくい。実際に大腸癌以外の膵管腺癌や乳癌の非浸潤性小葉癌、および悪性度が高いと考えられる大腸癌由来細胞株の多くは DPEP1 の発現は低い (Austruy et al. 1993,

Green et al. 2009, Zhang et al. 2012) 。したがって単純に DPEP1 の発現レベルから、一般的な癌の悪性度や予後を論ずることは困難であろう。少なくとも大腸癌では、細胞に強い酸化ストレスが生じ得る限定された状況、例えば上皮間葉転換、浸潤、転移、抗癌剤投与といった局面で DPEP1 の発現が癌細胞の生存に有利に働く可能性がある。今後は、様々な臨床病態と DPEP1 の形態学的な分布解析を合わせた詳細な検討が必要である。さらに、DPEP1 の局在する場所により、低分化型の癌または、高分化型の癌という識別ができるように、臨床試料での DPEP1 発現の局在パターンなどと合わせて実験を行っていきたい。

## 5. 図の説明

図1 DPEP1 のドメイン構造 (A)と細胞膜上の2量体構造 (B)

(A) 黄緑：シグナルペプチド (16 アミノ酸)、赤：活性に重要なアミノ酸、青：分子内ジスルフィド結合 ( $^{71}\text{Cys}$  と  $^{154}\text{Cys}$ ,  $^{226}\text{Cys}$  と  $^{258}\text{Cys}$ )、橙色：分子間ジスルフィド結合 ( $^{361}\text{Cys}$ )、黒：GPI アンカー部位 (B) C 末端近傍のシステインを介したジスルフィド結合により二量体を形成する。赤丸：活性部位、青丸：Zn イオン

図2 種々のヒト由来細胞株における DPEP1 発現量の比較 (A) HCC56 細胞 CaCO2 細胞の位相差顕微鏡観察 (B)

(A) 3 日間培養した HeLa, LoVo, RKO, HT29, SW480, HCC56, CaCO2, A549 細胞の抽出液を非還元状態で電気泳動し、ウサギ抗 DPEP1 抗体を用いて Western blot 法を行った。また、ローディングコントロールとして GAPDH 抗体を用いた。赤矢印は DPEP1 のバンドを示す。SE: short exposure, LE: long exposure (B) 3 日間あるいは 8 日間培養した HCC56 細胞と CaCO2 細胞の位相差顕微鏡像を示す。Bars : 100  $\mu\text{m}$ .

図3 ラット抗 DPEP1 抗体とウサギ抗 DPEP1 抗体の評価と DPEP1 の細胞内局在

(A) DPEP1 si RNA (DPEP1-si #1) あるいは control siRNA (si ctrl) を用いて 3 日間発現抑制した HCC56 細胞の抽出液、及び GFP (GFP overexpression (O/E)) あるいは DPEP1 (DPEP1 O/E) を強制発現させた HCC56 細胞の抽出液を非還元状態で電気泳動し、ラット抗 DPEP1 抗体 (左) 及びウサギ抗 DPEP1 抗体 (右) を用いて Western blot 法を行った。ローディングコントロールとして GAPDH 抗体を用いた。赤矢印は DPEP1 のバンドを示す。(B) DPEP1 (DPEP1-si #1) あるいは control siRNA (si ctrl) を用いて発現抑制した HCC56 細胞を固定し、ラット抗 DPEP1 抗体 (緑) 及びウサギ抗 DPEP1 抗体 (緑) を用いて免疫蛍光法を行った。青色は hoechst による核染像である。Bars : 5  $\mu\text{m}$  (C) 3 日間培養した HCC56 細胞を固定し、ラット抗 DPEP1 (緑) とウサギ抗 DPEP1 抗体 (赤) を用いて二重免疫蛍光法を行った。右に merge 像を示す。X-Y 画像の水平線の位置でスライスした X-Z 画像を下に示す。白矢印はラット抗体で陽性だがウサギ抗体では陰性のシグナル、黒矢印は apical (ap) 方向を示す。Bars: 5  $\mu\text{m}$ .

#### 図 4 ヒト大腸癌組織における DPEP1 の局在

(A-C) HCC56細胞の異種移植組織のパラフィン切片 (A; HE 染色) において、GST (B) あるいは GST-DPEP1 (C) タンパク質で吸収を行ったウサギ抗 DPEP1 抗体を用いて免疫蛍光法を行った。緑が DPEP1 シグナル、青が hoechst 染色による核染色を示す。A に近接する切片を用いて染色を行い、黒枠に相当する部位を B, C に示す。Bars : A, 1 mm、B, C, 200  $\mu$ m. (D-F) ヒト大腸癌組織アレイを用いて、DPEP1 の免疫蛍光法を行った。腫瘍に隣接する正常部位 (D)、および大腸癌組織 (E: Grade 1, F: Grade2-Grade3) を示す。挿入図は赤枠の拡大を示す。Bars : 20  $\mu$ m.

#### 図 5 培養期間による DPEP1 局在の変化

3 日間及び 7 日間培養した HCC56 細胞を固定し、ラット抗 DPEP1 抗体 (緑) とマウス抗 E-cadherin 抗体 (A: 赤)、ウサギ抗 c-Met 抗体 (B: 赤)、あるいは、マウス抗 ZO-1 抗体 (C: 赤) を用いて二重免疫蛍光法を行った。merge 像を示す。X-Y 画像の水平線的位置でスライスした X-Z 画像を下に示す。矢印は apical (ap) 方向を示す。Bars: 5  $\mu$ m.

#### 図 6 DPEP1 陽性ドメインの同定

3 日間培養した HCC56 細胞を固定し、ラット抗 DPEP1 抗体 (緑) とマウス抗 CD59 抗体 (A: 赤)、マウス抗 flotillin-1 抗体 (B: 赤)、ウサギ抗 caveolin 抗体 (C: 赤)、あるいはウサギ抗 Ezrin 抗体 (D: 赤) を用いて二重免疫蛍光法を行った。X-Y 画像の水平線的位置でスライスした X-Z 画像を下に示す。Bars : 5  $\mu$ m.

#### 図 7 免疫電子顕微鏡法による DPEP1 の局在解析

3 日間培養した HCC56 細胞において、包埋前金コロイド増感法を用いた免疫電子顕微鏡法により DPEP1 の局在解析を行った。A 及び C の黒枠部位を拡大し、それぞれ B と D に示す。N : nucleus、Bars : 2  $\mu$ m.

#### 図 8 DPEP1 の発現低下が HCC56 細胞の増殖能に与える影響

(A) 2 種類の DPEP1 siRNA (DPEP1-si #1, DPEP1-si #2) 、あるいは対照 siRNA (si ctrl) を HCC56 細胞に導入した。1, 3, 5, 7 日間培養した後に DPEP1 の発現を Western blot 法により解析した。ローディングコントロールとして GAPDH のバンドを示す。(B) 上記実験において細胞数を Cell Counting Kit-8 で評価した結果。白丸 : DPEP1-si #1、白四角 : DPEP1-si #2、黒丸 : 対照 siRNA。統計学的検定にはウェルチの t 検定 ( $p < 0.05$ ) を用いた。ns: not significant. (C) DPEP1 を安定に発現低下する 2 種類の細胞 (H56-DPEP1-KD1, H56-DPEP1-KD2) およびコントロールベクターを導入した細胞 (H56-pLKO) を 3 日間培養し、DPEP1 の発現を Western blot 法により解析した。ローディングコントロールとして GAPDH 抗体を用いた。(D) これら細胞をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍容積 ( $\text{mm}^3$ ; mean  $\pm$  SD,  $n = 10$  [5 匹のマウスを使用])および腫瘍重量 (g; mean  $\pm$  SD,  $n = 10$  [5 匹のマウスを使用])を示したグラフ。青 : H56-pLKO、赤 : H56-DPEP1-KD1、緑 : H56-DPEP1-KD2。統計学的検定にはウェルチの t 検定 ( $p < 0.05$ ) を用いた。ns: not significant.

#### 図 9 DPEP1 発現が異種移植組織の形態に与える影響

H56-DPEP1-KD1 細胞、H56-DPEP1-KD2 細胞、あるいは H56-pLKO 細胞を用いて異種移植組織を作製し、固定、パラフィン切片を作製した。抗ウサギ DPEP1 抗体 (緑) と抗マウス E-cadherin 抗体 (赤 ; A, B, C) または抗マウス ZO-1 抗体 (赤 ; D, E, F) で二重免疫蛍光法を行った。Bars : 20  $\mu\text{m}$ .

#### 図 10 HCC56 細胞とヒト乳癌由来細胞株 MDA-MB-231 細胞の遊走能及び浸潤能の検討

(A) HCC56 細胞とヒト乳癌由来細胞株 MDA-MB-231 細胞を 3 日間培養し、DPEP1 の発現量を Western blot 法により解析した。ローディングコントロールとして GAPDH のバンドを示す。(B-E) HCC56 細胞と MDA-MB-231 細胞を control insert chamber (B,D) 及び matrigel invasion chamber (C,E) にて、24 時間培養を行った後、メンブレン底部に移動した細胞を固定し、トルイジンブルー染色した。

# 図 11 酸化ストレス誘導実験

HCC56 細胞を 2 種類の DPEP1 siRNA (DPEP1-si #1, DPEP1-si #2) あるいは control siRNA (si ctrl) を用いて 3 日間培養した。細胞抽出液を作製し DPEP1 発現を Western blot 法で解析した(A)。ローディングコントロールとして GAPDH のバンドを示す。また同条件で培養した細胞に、ひ酸水素二ナトリウム七水和物水溶液 (AsV : 400  $\mu$ M) 、あるいは PBS を加え、20 時間培養を行った。細胞を固定し、ウサギ 抗 4-Hydroxynonenal (4-HNE) 抗体 (B)、あるいはウサギ 抗 Phospho-Histone H2AX (p-H2AX) 抗体と hoechst (C) を用いて免疫蛍光法を行った。Bars : (B) 20  $\mu$ m, (C) 100  $\mu$ m。さらに細胞核あたりの p-H2AX 染色強度を定量化し、グラフ化した (D)。統計学的検定にはウェルチの t 検定を用いた。\*:  $p < 0.001$

## 6. 参考文献

- Adachi, H., N. Ishida and M. Tsujimoto "*Primary structure of rat renal dipeptidase and expression of its mRNA in rat tissues and COS-1 cells.*" *Biochim Biophys Acta*, 1992. 1132(3): 311-314.
- Armstrong, D. J., S. K. Mukhopadhyay and B. J. Campbell "*Physicochemical characterization of renal dipeptidase.*" *Biochemistry*, 1974. 13(8): 1745-1750.
- Austruy, E., M. Cohen-Salmon, C. Antignac, C. Beroud, I. Henry, V. C. Nguyen, L. Brugieres, C. Junien and C. Jeanpierre "*Isolation of kidney complementary DNAs down-expressed in Wilms' tumor by a subtractive hybridization approach.*" *Cancer Res*, 1993. 53(12): 2888-2894.
- Birnbaum, J., F. M. Kahan, H. Kropp and J. S. MacDonald "*Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin.*" *Am J Med*, 1985. 78(6a): 3-21.
- Campbell, B. J. "*Renal Dipeptidase.*" *Methods in Enzymology*, 1970. 19.
- Campbell, B. J., S. F. Baker, S. D. Shukla, L. J. Forrester and W. L. Zahler "*Bioconversion of leukotriene D4 by lung dipeptidase.*" *Biochim Biophys Acta*, 1990. 1042(1): 107-112.
- Campbell, B. J., Y. C. Lin, R. V. Davis and E. Ballew "*The purification and properties of a particulate renal dipeptidase.*" *Biochim Biophys Acta*, 1966. 118(2): 371-386.
- Eisenach, P. A., E. Soeth, C. Roder, G. Kloppel, J. Tepel, H. Kalthoff and B. Sipos "*Dipeptidase 1 (DPEP1) is a marker for the transition from low-grade to*

- high-grade intraepithelial neoplasia and an adverse prognostic factor in colorectal cancer.*" Br J Cancer, 2013. 109(3): 694-703.
- Estrela, J. M., A. Ortega and E. Obrador "*Glutathione in cancer biology and therapy.*" Crit Rev Clin Lab Sci, 2006. 43(2): 143-181.
- Green, A. R., S. Krivinskas, P. Young, E. A. Rakha, E. C. Paish, D. G. Powe and I. O. Ellis "*Loss of expression of chromosome 16q genes DPEP1 and CTCF in lobular carcinoma in situ of the breast.*" Breast Cancer Res Treat, 2009. 113(1): 59-66.
- Habib, G. M., Z. Z. Shi, A. A. Cuevas, Q. Guo, M. M. Matzuk and M. W. Lieberman "*Leukotriene D4 and cystinyl-bis-glycine metabolism in membrane-bound dipeptidase-deficient mice.*" Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(9): 4859-4863.
- Habib, G. M., Z. Z. Shi, A. A. Cuevas and M. W. Lieberman "*Identification of two additional members of the membrane-bound dipeptidase family.*" Faseb j, 2003. 17(10): 1313-1315.
- Hooper, N. M., M. G. Low and A. J. Turner "*Renal dipeptidase is one of the membrane proteins released by phosphatidylinositol-specific phospholipase C.*" Biochem J, 1987. 244(2): 465-469.
- Huber, M. and D. Keppler "*Inhibition of leukotriene D4 catabolism by D-penicillamine.*" Eur J Biochem, 1987. 167(1): 73-79.
- Inamura, T., W. M. Pardridge, Y. Kumagai and K. L. Black "*Differential tissue expression of immunoreactive dehydropeptidase I, a peptidyl leukotriene metabolizing enzyme.*" Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1994. 50(2): 85-92.



- Kahan, F. M., H. Kropp, J. G. Sundelof and J. Birnbaum "*Thienamycin: development of imipenen-cilastatin.*" J Antimicrob Chemother, 1983. 12 Suppl D: 1-35.
- Kawanishi, S., Y. Hiraku, S. Pinlaor and N. Ma "*Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis.*" Biol Chem, 2006. 387(4): 365-372.
- Kozak, E. M. and S. S. Tate "*Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes.*" J Biol Chem, 1982. 257(11): 6322-6327.
- Kropp, H., J. G. Sundelof, R. Hajdu and F. M. Kahan "*Metabolism of thienamycin and related carbapenem antibiotics by the renal dipeptidase, dehydropeptidase.*" Antimicrob Agents Chemother, 1982. 22(1): 62-70.
- Liotta, L. A., C. W. Lee and D. J. Morakis "*New method for preparing large surfaces of intact human basement membrane for tumor invasion studies.*" Cancer Lett, 1980. 11(2): 141-152.
- Mayor, S. and H. Riezman "*Sorting GPI-anchored proteins.*" Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. 5(2): 110-120.
- McIver, C. M., J. M. Lloyd, P. J. Hewett and J. E. Hardingham "*Dipeptidase 1: a candidate tumor-specific molecular marker in colorectal carcinoma.*" Cancer Lett, 2004. 209(1): 67-74.
- Nitanai, Y., Y. Satow, H. Adachi and M. Tsujimoto "*Crystal structure of human renal dipeptidase involved in beta-lactam hydrolysis.*" J Mol Biol, 2002. 321(2): 177-184.

Okamoto, T., N. Matsumura, M. Mandai, T. Oura, Y. Yamanishi, A. Horiuchi, J.

Hamanishi, T. Baba, M. Koshiyama, T. Shiozawa and I. Konishi

*"Distinguishing primary from secondary mucinous ovarian tumors: an algorithm using the novel marker DPEP1."* Mod Pathol, 2011. 24(2): 267-276.

Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto and M. Seiki "A

*matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells."*

Nature, 1994. 370(6484): 61-65.

Szatrowski, T. P. and C. F. Nathan *"Production of large amounts of hydrogen peroxide*

*by human tumor cells."* Cancer Res, 1991. 51(3): 794-798.

Toiyama, Y., Y. Inoue, H. Yasuda, S. Saigusa, T. Yokoe, Y. Okugawa, K. Tanaka, C. Miki

and M. Kusunoki *"DPEP1, expressed in the early stages of colon carcinogenesis,*

*affects cancer cell invasiveness."* J Gastroenterol, 2011. 46(2): 153-163.

Zhang, G., A. Schetter, P. He, N. Funamizu, J. Gaedcke, B. M. Ghadimi, T. Ried, R.

Hassan, H. G. Yfantis, D. H. Lee, C. Lacy, A. Maitra, N. Hanna, H. R. Alexander

and S. P. Hussain *"DPEP1 inhibits tumor cell invasiveness, enhances*

*chemosensitivity and predicts clinical outcome in pancreatic ductal*

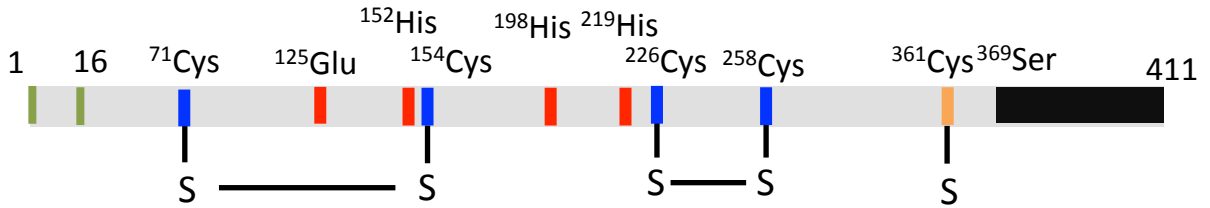
*adenocarcinoma."* PLoS One, 2012. 7(2): e31507.

## 7. 謝辞

本研究を行い、学位論文をまとめるにあたりまして、指導教官として多大なご尽力とご指導を賜りました解剖・組織学講座 和栗聡教授に深く感謝申し上げます。また、たくさんのご指導、ご助言をくださいました解剖・組織学講座 山本雅哉准教授、植村武文先生、名古屋大学 亀高諭教授、抗体作製や実験方法に関しましてご助言くださった徳島大学 澤田直樹先生、電顕試料作製及び観察手法をご教示くださいました解剖・組織学講座 矢橋あつ子氏、菅野勝行氏に、深く感謝いたします。医学部大学院への進学と分子生物学実験を行う場を与えてくださいました器官制御外科学講座 竹之下誠一教授に深く感謝の意を表します。最後に、最後まであたたかく見守ってくださった解剖・組織学講座の皆様

に深く感謝いたします。

A



B

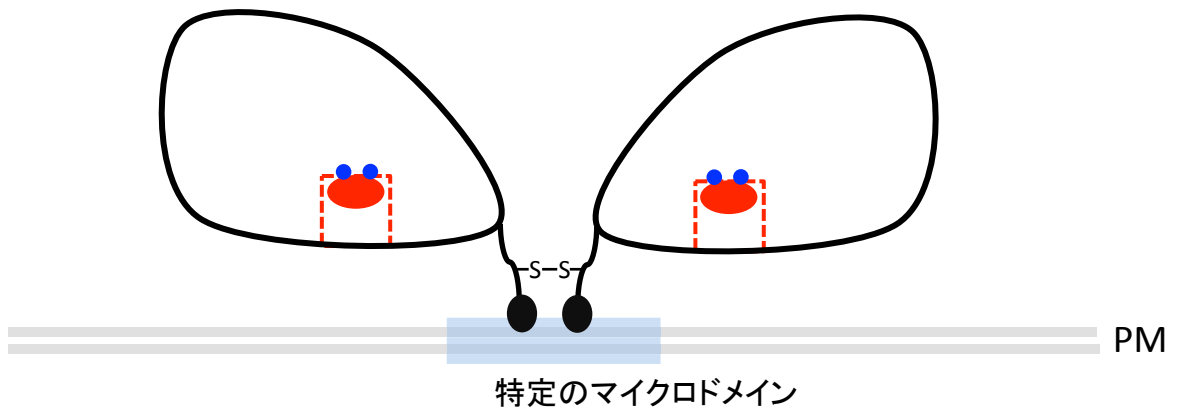


図1 DPEP1のドメイン構造 (A)と細胞膜上の2量体構造 (B)

(A) 黄緑：シグナルペプチド (16アミノ酸)、赤：活性に重要なアミノ酸、青：分子内ジスルフィド結合 (71Cysと154Cys, 226Cysと258Cys)、橙色：分子間ジスルフィド結合(361Cys)、黒：GPIアンカー部位 (B) C末端近傍のシステインを介したジスルフィド結合により二量体を形成する。赤丸：活性部位, 青丸：Znイオン

A

B

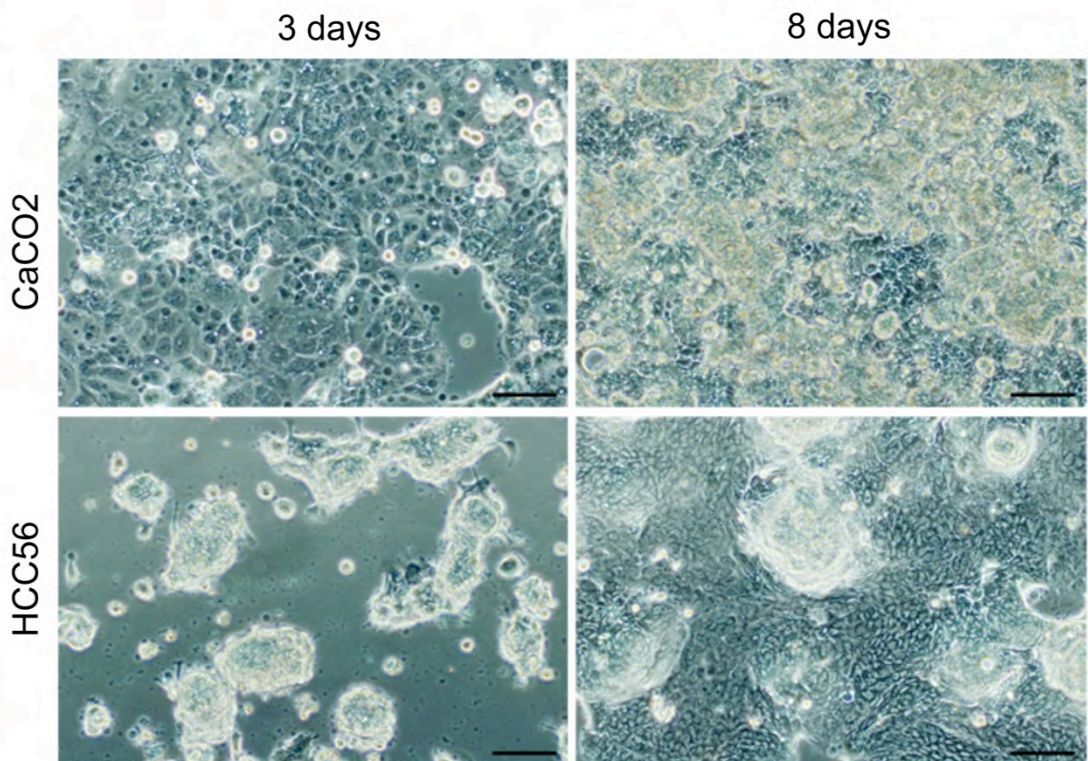


図2 種々のヒト由来細胞株におけるDPEP1発現量の比較 (A) HCC56細胞CaCO2細胞の位相差顕微鏡観察 (B)

(A) 3日間培養したHeLa, LoVo, RKO, HT29, SW480, HCC56, CaCO2, A549細胞の抽出液を非還元状態で電気泳動し、ウサギ抗DPEP1抗体を用いてWestern blot法を行った。また、ローディングコントロールとしてGAPDH抗体を用いた。赤矢印はDPEP1のバンドを示す。SE: short exposure, LE: long exposure (B) 3日間あるいは8日間培養したHCC56細胞とCaCO2細胞の位相差顕微鏡像を示す。Bars : 100  $\mu$ m.

図3 ラット抗DPEP1抗体とウサギ抗DPEP1抗体の評価とDPEP1の細胞内局在

(A) DPEP1 si RNA (DPEP1-si #1) あるいはcontrol siRNA (si ctrl) を用いて3 日間発現抑制したHCC56細胞の抽出液、及びGFP (GFP overexpression (O/E) ) あるいはDPEP1 (DPEP1 O/E) を強制発現させたHCC56細胞の抽出液を非還元状態で電気泳動し、ラット抗DPEP1抗体 (左) 及びウサギ抗DPEP1抗体 (右) を用いてWestern blot法を行った。ローディングコントロールとしてGAPDH抗体を用いた。赤矢印はDPEP1のバンドを示す。(B) DPEP1 (DPEP1-si #1) あるいはcontrol siRNA (si ctrl) を用いて発現抑制したHCC56細胞を固定し、ラット抗DPEP1 抗体 (緑) 及びウサギ抗DPEP 1 抗体 (緑) を用いて免疫蛍光法を行った。青色はhoechstによる核染像である。Bars : 5  $\mu$ m (C) 3 日間培養したHCC56細胞を固定し、ラット抗DPEP1 (緑) とウサギ抗DPEP1抗体 (赤) を用いて二重免疫蛍光法を行った。右にmerge像を示す。X-Y画像の水平線の位置でスライスしたX-Z画像を下に示す。白矢印はラット抗体で陽性だがウサギ抗体では陰性のシグナル、黒矢印はapical (ap) 方向を示す。Bars: 5  $\mu$ m.

#### 図4 ヒト大腸癌組織におけるDPEP1の局在

(A-C) HCC56細胞の異種移植組織のパラフィン切片 (A; HE 染色) において、GST (B) あるいはGST-DPEP1 (C) タンパク質で吸収を行ったウサギ抗DPEP1抗体を用いて免疫蛍光法を行った。緑がDPEP1シグナル、青がhoechst染色による核染色を示す。Aに近接する切片を用いて染色を行い、黒枠に相当する部位をB, Cに示す。Bars : A, 1 mm、B, C, 200  $\mu$ m. (D-F) ヒト大腸癌組織アレイを用いて、DPEP1の免疫蛍光法を行った。腫瘍に隣接する正常部位 (D)、および大腸癌組織 (E: Grade 1, F : Grade2-Grade3) を示す。挿入図は赤枠の拡大を示す。Bars : 20  $\mu$ m.



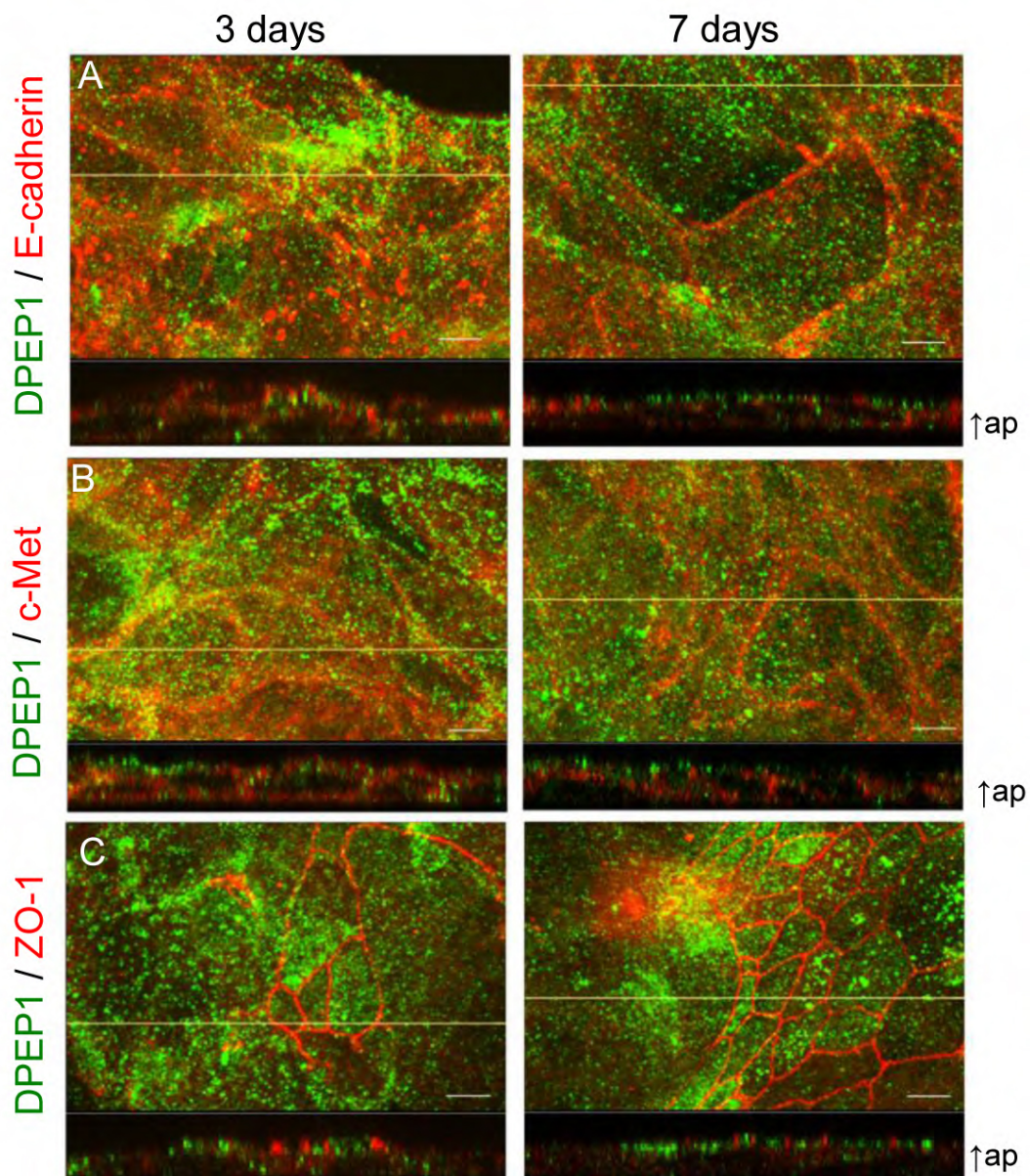


図5 培養期間によるDPEP1局在の変化

3日間及び7日間培養したHCC56細胞を固定し、ラット抗DPEP1抗体（緑）とマウス抗E-cadherin抗体（A：赤）、ウサギ抗c-Met抗体（B：赤）、あるいは、マウス抗ZO-1抗体（C：赤）を用いて二重免疫蛍光法を行った。merge像を示す。X-Y画像の水平線の位置でスライスしたX-Z画像を下に示す。矢印はapical (ap) 方向を示す。Bars: 5  $\mu$ m.



## 図6 DPEP1陽性ドメインの同定

3日間培養したHCC56細胞を固定し、ラット抗DPEP1抗体(緑)とマウス抗CD59抗体(A:赤)、マウス抗flotillin-1抗体(B:赤)、ウサギ抗caveolin抗体(C:赤)、あるいはウサギ抗Ezrin抗体(D:赤)を用いて二重免疫蛍光法を行った。X-Y画像の水平線の位置でスライスしたX-Z画像を下に示す。Bars: 5  $\mu$ m。

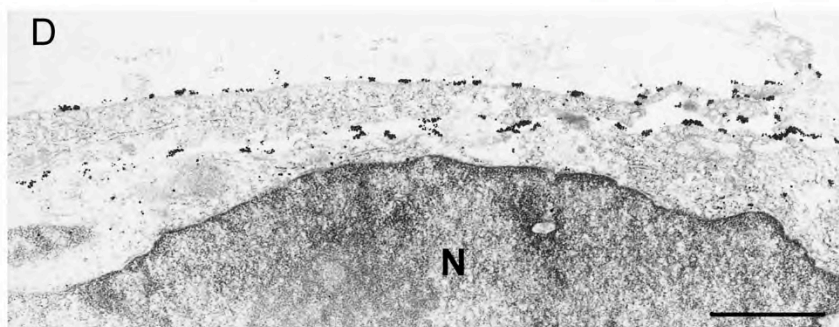
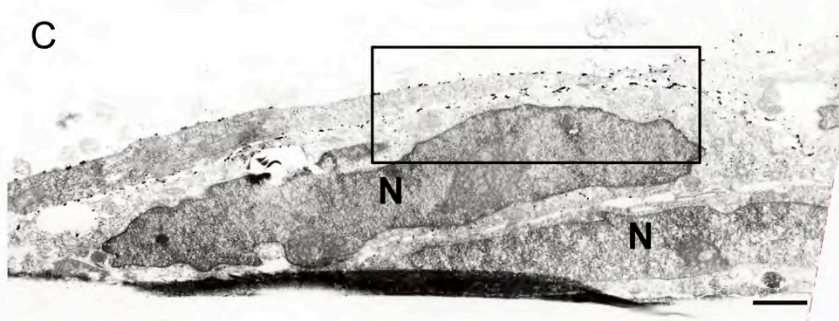
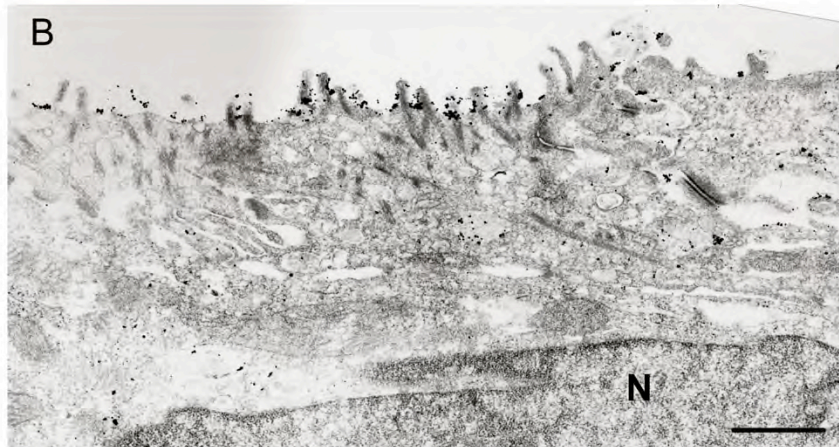
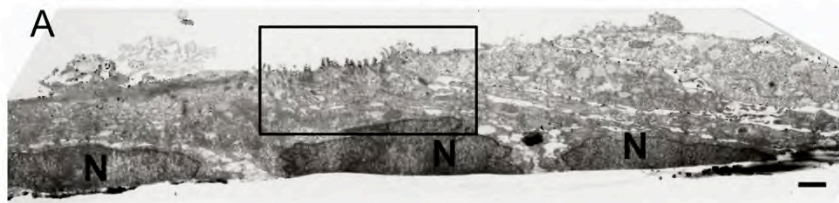


図7 免疫電子顕微鏡法によるDPEP1の局在解析

3日間培養したHCC56細胞において、包埋前金コロイド増感法を用いた免疫電子顕微鏡法によりDPEP1の局在解析を行った。A及びCの黒枠部位を拡大し、それぞれBとDに示す。 N: nucleus、 Bars: 2  $\mu$ m.

#### 図8 DPEP1の発現低下がHCC56細胞の増殖能に与える影響

(A) 2種類のDPEP1 siRNA (DPEP1-si #1, DPEP1-si #2)、あるいは対照 siRNA (si ctrl) を HCC56細胞に導入した。1, 3, 5, 7日間培養した後にDPEP1の発現をWestern blot法により解析した。ローディングコントロールとしてGAPDHのバンドを示す。(B) 上記実験において細胞数をCell Counting Kit-8で評価した結果。白丸：DPEP1-si #1、白四角：DPEP1-si #2、黒丸：対照siRNA。統計学的検定にはウェルチのt検定 ( $p < 0.05$ ) を用いた。ns: not significant . (C) DPEP1を安定に発現低下する2種類の細胞 (H56-DPEP1-KD1, H56-DPEP1-KD2) およびコントロールベクターを導入した細胞 (H56-pLKO) を3日間培養し、DPEP1の発現をWestern blot法により解析した。ローディングコントロールとしてGAPDH抗体を用いた。(D) これら細胞をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍容積 ( $\text{mm}^3$ ; mean  $\pm$  SD,  $n = 10$  [5匹のマウスを使用]) および腫瘍重量 (g; mean  $\pm$  SD,  $n = 10$  [5匹のマウスを使用]) を示したグラフ。青：H56-pLKO、赤：H56-DPEP1-KD1、緑：H56-DPEP1-KD2。統計学的検定にはウェルチのt検定 ( $p < 0.05$ ) を用いた。ns: not significant.

図9 DPEP1発現が異種移植組織の形態に与える影響

H56-DPEP1-KD1細胞、H56-DPEP1-KD2細胞、あるいはH56-pLKO細胞を用いて異種移植組織を作製し、固定、パラフィン切片を作製した。抗ウサギDPEP1抗体 (緑) と抗マウスE-cadherin抗体 (赤 ; A, B, C) または抗マウスZO-1抗体 (赤 ; D, E, F) で二重免疫蛍光法を行った。 Bars : 20  $\mu$ m.

図10 HCC56細胞とヒト乳癌由来細胞株MDA-MB-231細胞の遊走能及び浸潤能の検討  
(A) HCC56細胞とヒト乳癌由来細胞株MDA-MB-231細胞を3日間培養し、DPEP1の発現量をWestern blot法により解析した。ローディングコントロールとしてGAPDHのバンドを示す。(B-E) HCC56細胞とMDA-MB-231細胞をcontrol insert chamber (B,D) 及びmatrigel invasion chamber (C,E) にて、24時間培養を行った後、メンブレン底部に移動した細胞を固定し、トルイジンブルー染色した。

A

C

p-H2AX

B

D

#### 図11 酸化ストレス誘導実験

HCC56細胞を2種類のDPEP1 siRNA (DPEP1-si #1, DPEP1-si #2) あるいはcontrol siRNA (si ctrl) を用いて3日間培養した。細胞抽出液を作製しDPEP1発現をWestern blot法で解析した(A)。ローディングコントロールとしてGAPDHのバンドを示す。また同条件で培養した細胞に、ヒ酸水素二ナトリウム七水和物水溶液 (AsV : 400  $\mu$ M)、あるいはPBSを加え、20時間培養を行った。細胞を固定し、ウサギ 抗 4-Hydroxynonenal (4-HNE) 抗体 (B)、あるいはウサギ抗Phospho-Histone H2AX (p-H2AX) 抗体とhoechst (C) を用いて免疫蛍光法を行った。Bars : (B) 20  $\mu$ m, (C) 100  $\mu$ m。さらに細胞核あたりのp-H2AX染色強度を定量化し、グラフ化した (D)。統計学的検定にはウェルチのt検定を用いた。\*:  $p < 0.001$