

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659088

研究課題名(和文) 癌細胞の生存戦略に関する新規細胞膜ドメイン構造の解析

研究課題名(英文) Analyses of a novel membrane domain involved in the survival strategy for cancer cell

研究代表者

和栗 聡 (Waguri, Satoshi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30244908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジペプチダーゼ(DPEP1)は大腸癌のマーカーとして知られている。その癌病態における機能や意義を探る目的で、DPEP1を高発現する胃癌/大腸癌由来HCC56細胞株を見出した。次にHCC56細胞を用いて局在解析を進めたところ、DPEP1がGPI-アンカー型タンパク質特有の膜ドメインと微絨毛基部に局在すること明らかにした。さらにRNAiによる発現低下実験を行った所、DPEP1は細胞増殖には関与せず、酸化ストレス耐性機構に寄与することを見出した。本研究により、大腸癌の治療標的としてDPEP1が関与する新たな機構を提唱することができた。

研究成果の概要(英文)：Cellular localization and functions of dipeptidase 1 (DPEP1), a marker of colorectal cancer, were investigated in this study. In a HCC56 cell line that expresses DPEP1 at high levels, DPEP1 was found to be localized on plasma membrane domains containing GPI-anchored protein, and at the bottom of microvilli. Suppression of DPEP1 by RNAi experiment did not affect the cell growth, but caused a vulnerability to oxidative stress, suggesting that DPEP1 might be involved in the tolerance of cancer cells against oxidative stress. Therefore, this study proposes a new mechanism involving DPEP1, which could be a target of anticancer drug development.

研究分野：細胞生物学、細胞組織学

キーワード：Dipeptidase1 癌細胞 膜ドメイン 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

癌細胞の生存戦略の一つとして、細胞内グルタチオン (GSH) 濃度を高めることによる抗酸化ストレス効果および抗癌剤耐性機構が知られている。Dipeptidase1 (DPEP1; EC 3.4.13.11) は、細胞外グルタチオンの分解代謝に関与する 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酵素として古くから知られていた。酵素学的には、亜鉛依存型のメタロプロテアーゼであり、基質としては様々な種類のジペプチド、カルバペナム系抗生物質のラクタム環、グルタチオン (GSH; γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) 代謝産物であるシステイニルグリシン、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) が報告されている (Kozak and Tate 1982, Kropp et al. 1982, Huber and Keppler 1987, Campbell et al. 1990)。

さらに最近、大腸癌で高発現を示すマーカー候補遺伝子としての報告が相次いだ (McIver et al., Cancer letter, 2004; Toiyama et al., J Gastroenterol., 2011; Okamoto et al., Mod. Pathol, 2011; Eisenach et al. 2013)。しかし、そ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、近年 Eisenach らは逆に正の相関があることを報告している。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)。

以上のように、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。

2. 研究の目的

本研究では大腸癌細胞における 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する。また、それら細胞を用いて DPEP1 の詳細な細胞内局在解析および癌細胞における機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 抗体

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。

(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)、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、ヒト乳がん由来細胞株

MDA-MB-231 細胞について、10% FBS 添加 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を培養液として用い、37℃、5% CO₂ 環境下で培養した。

(2) SDS-PAGE 及び Western blotting

培養細胞を 1% プロテアーゼインヒビターと 1% フォスファターゼインヒビターを含む 1% Triton X-100 / PBS を用いて溶解し、抽出液を作成した。タンパク質 10 μ g / lane を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、非還元状態で電気泳動を行った。その後、polyvinylidene difluoride 膜に転写し、抗 DPEP1 抗体を室温で 1 時間反応させ、次いで二次抗体を室温で 30 分間反応させ、化学発光試薬で発光させ、LAS-4000 (GE ヘルスケア・ジャパン) で検出した。

(3) 免疫蛍光染色法

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 細胞をまき、培養した。4% パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定後、0.1% Triton X-100 / PBS で透過処理を行った。2% 正常ヤギ血清と 0.1% Tween-20 を含む PBS でブロッキングした後、一次抗を反応させた。ブロッキング後、一次抗体を反応させた。Alexa 488 あるいは Alexa 594 標識二次抗体を反応させた。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, オリンパス) を用いた。

パラフィン包埋した異種移植組織の場合、キシレンによる脱パラフィン後、イムノセイバー (日新 EM) により抗原賦活化液を行った。その後は上述と同様。

(4) 免疫電子顕微鏡法

包埋前免疫金コロイド増感法を用いた。細胞を 4% ショ糖 - 4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M PB (pH 7.4) で固定後、0.25% サポニン / 0.1 M PB 溶液で膜透過処理を行った。ラット抗 DPEP1 抗体、次いで二次抗体を反応させた。1% グルタルアルデヒド / 0.1 M PB 溶液で固定を行った後、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 溶液で後固定を行った。エポキシ樹脂へ包埋後、60 nm の超薄切片を作製し、電子顕微鏡 (JEM1200EX, JEOL) で観察した。

(5) RNA 干渉法 (RNAi)

6-well カルチャープレートに HCC56 細胞をまき、24 時間後、siRNA 混合試薬を添加した。細胞を 1 から 5 日間培養した。

DPEP1 の安定発現低下株を作製するために対照および DPEP1 cDNA に対する shRNA を導入するためのレンチウイルスベクターを作製した。これを HCC56 細胞に感染させ、スクリーニングを経てそれぞれの shRNA を発現する細胞株を得た。

(6) 増殖能評価

細胞を 96-well カルチャープレートにて培養し、1、3、5 日後の細胞数を Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を用いて解析した。

(7) 異種移植実験

1.5×10^7 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 / c 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、腫瘍容積を算出した。6 週間後、麻醉下に腫瘍組織を摘出、固定後、パラフィン切片作製、免疫組織蛍光法を行った。

(8) 酸化ストレス誘導実験と DNA 損傷の評価

HCC56 細胞を PBS あるいは $400 \mu\text{M}$ ヒ酸水素二ナトリウム七水和物水溶液 (AsV) を加え、20 時間培養した。4% パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定し、抗 p-H2AX 抗体を用いて免疫蛍光法を行った。落射型蛍光顕微鏡で、1 カバースリップあたりランダムに 5 視野の画像 ($480 \mu\text{m} \times 360 \mu\text{m}$) を撮影し、HISTO QUEST TISSUE ANALYSIS SOFTWARE (TISSUE GNOSTICS) を用いて、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。

4. 研究成果

(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 1A)。

したがって、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、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作る特徴を有していた (図 1B)。

(2) 抗 DPEP1 抗体の評価と HCC56 細胞における分布

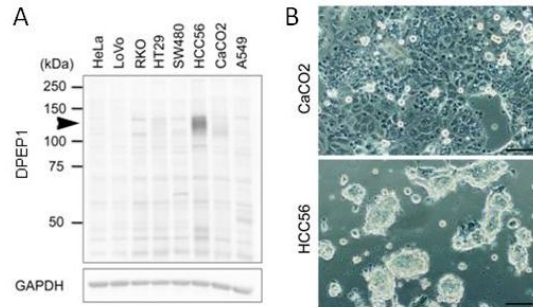


図1 ヒト由来細胞株におけるDPEP1タンパク質発現量の比較(A)およびHCC56細胞とCaCO2細胞の位相差顕微鏡像(B)

(A) 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、Western blot法を行った。内部対照としてGAPDHを示す。矢頭はDPEP1を示す。(B)培養開始3日後のHCC56細胞とCaCO2細胞の位相差顕微鏡像。Bars: 100 μm 。

これら抗体が免疫組織蛍光法に使用可能かどうかについては、RNAi 法により DPEP1 発現を低下させた HCC56 細胞、DPEP1 を一過性に過剰発現させた細胞、および DPEP1 エピトープの GST 融合リコンビナントタンパク質を用いた吸収実験を行うことにより確認した (データは割愛)。

(3) HCC56 細胞における DPEP1 の細胞内局在

培養開始後 3 日の HCC56 細胞は細胞塊として散在するが、上皮としての極性を有することは側底面マーカーである E-cadherin と c-Met、tight junction マーカーである ZO-1 の染色性により確認した (データは割愛)。

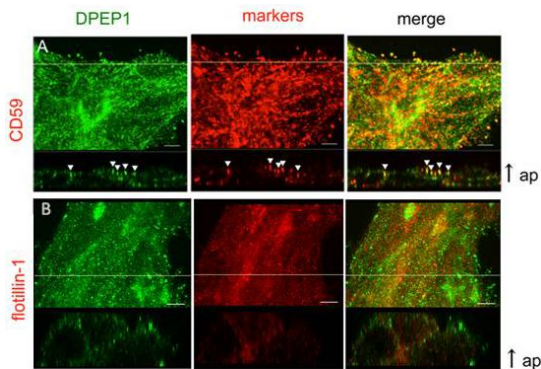


図2 DPEP1陽性ドメインの同定

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)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 μm 。

この条件で、DPEP1 局在を免疫蛍光法で解析したところ、DPEP1 は細胞頂面だけでなく側底面にも点状シグナルとして局在した。こ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質である 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 2A)。一方、一般的なラフトマーカーとされる flotillin-1 との二重免疫蛍光法を行った

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 2B)。

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、微絨毛や細胞表面の特定部位に集積する傾向を示した (図 3)。

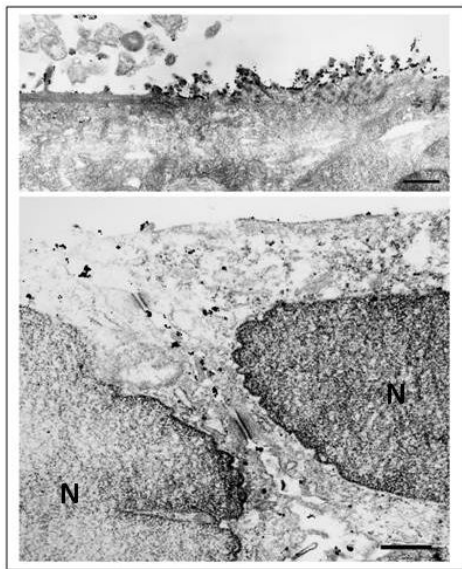


図3 免疫電子顕微鏡法によるDPEP1の局在解析
3 日間培養したHCC56細胞において、包埋前免疫金コロイド増感法を行った。N: nucleus、Bars: 2 μm.

(4) 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。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、この培養期間内で発現低下が維持されていることを確認した (図 3A)。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 3B)。

さらに shRNA を用いて DPEP1 の安定発現低下細胞株を作製した。Western blot 法により解析したところ、対照細胞株の約 46% にまで DPEP1 の発現が低下していた (図 3C)。これら細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍の容積変化を測定した結果、対照細胞と DPEP1 発現低下細胞との間に有意差は認められなかった (図 3D)。

(5) DPEP1 発現が組織形態に与える影響

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、DPEP1 安定発現低下細胞株の異種移植組織を用いて形態学的評価を行った。対照細胞組織に比べ、DPEP1 発現低下細胞の異種移植組織では、DPEP1 の発現が顕著に低下していた。

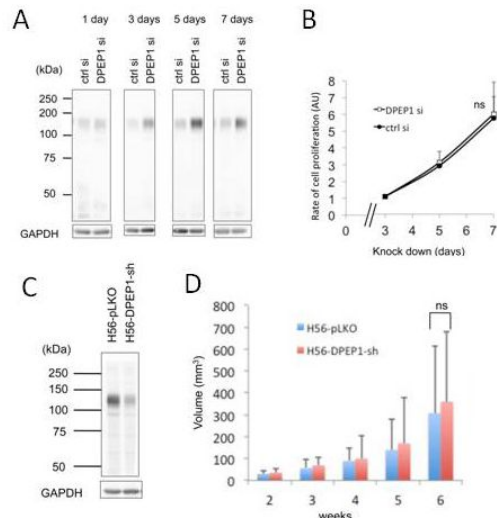


図4 DPEP1発現低下が細胞増殖能に与える影響

(A)対照 siRNA (si ctrl) あるいはDPEP1 siRNA (DPEP1-si)をHCC56細胞に導入し、1、3、5、7日間培養した後のDPEP1の発現をWestern blot法により解析した。GAPDHは内部対照。(B)細胞数をCell Counting Kit-8で評価した結果を示す。(C) DPEP1の安定発現低下細胞株(H56-DPEP1-sh)および対照ベクターを導入した細胞(H56-pLKO)を3日間培養し、DPEP1の発現を解析した。GAPDHは内部対照。(D)細胞をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍容積(mm³; mean ± SD, n = 10 [5匹のマウスを使用])を測定した。B、Dにおいて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.

さらに、極性形成のマーカーである E-cadherin (データは割愛) や ZO-1 の染色性には顕著な変化は観察されなかった (図 5A-D)。この結果は、DPEP1 の発現低下が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。

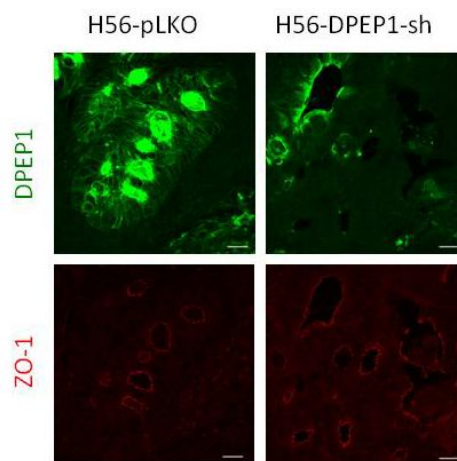


図5 DPEP1が異種移植組織の形態に与える影響

H56-DPEP1-sh細胞あるいはH56-pLKO細胞の異種移植組織を作製し、固定後、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ZO-1抗体(赤)で二重免疫蛍光法を行った。Bars: 20 μm.

(6) 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。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、評価不能であった（データは割愛）。

(7) DPEP1 の酸化ストレス耐性に与える影響

最後に、DPEP1 発現低下細胞株を用いて、酸化ストレスに対する耐性を解析した。400 μ M ひ酸水素二ナトリウム七水和物水溶液 (AsV) を 20 時間投与し、細胞障害の指標として、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。PBS 投与群の中で対照細胞と 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 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 6）。

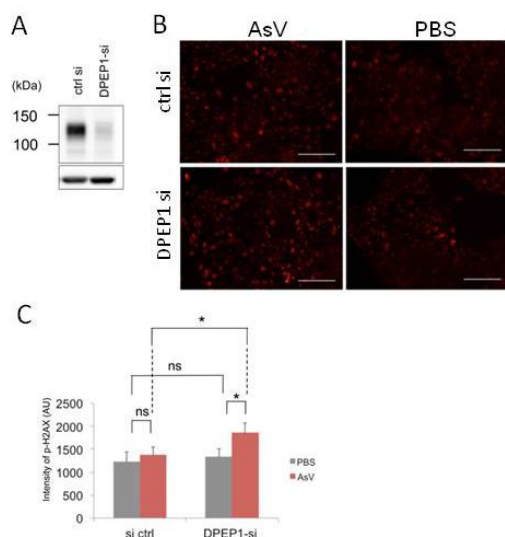


図6 酸化ストレス誘導によるDNA損傷の評価

(A) DPEP1 siRNA (DPEP1-si) あるいは対照 siRNA (si ctrl) を用いて3日間発現低下させたHCC56細胞におけるDPEP1発現を解析した。GAPDHは内部対照。(B) ひ酸水素二ナトリウム七水和物水溶液 (AsV: 400 μ M) あるいはPBSを加え、20時間培養を行った。細胞を固定し、ウサギ抗リン酸化ヒストンH2AX (p-H2AX) 抗体で免疫蛍光法を行った。Bars: 100 μ m。(C) 細胞核あたりのp-H2AX染色強度を定量化し、グラフ化した。統計学的検定にはウェルチのt検定を用いた。*: $p < 0.01$, ns: not significant

(7) 結論

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。最近、DPEP1 発現が大腸癌の予後に正あるいは負の相関があるとする報告が相次いでおり、その真偽は未解決である。

DPEP1 発現が細胞の酸化ストレス耐性に寄与する機構とその普遍性が明らかにされれば、DPEP1 を標的とする新たな治療戦略の糸口を見出すことができよう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

Nagai C, Uemura T, Sawada N, Yamamoto M, Takenoshita S, Waguri S: Functional analyses of dipeptidase-1 (DPEP1) using a colon/gastric cancer-derived cell line, HCC56. 第120回日本解剖学会総会全国学術集会・第92回日本生理学会大会, 2015年3月21-23日: 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

永井千晴, 澤田直樹, 渡辺慎哉, 竹之下誠一, 和栗聡: ヒト胃癌/大腸癌細胞株における Dipeptidase-1 の機能、局在解析. 第73回日本癌学会学術総会: 2014年9月25-27日: パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

永井千晴, 植村武文, 山本雅哉, 澤田直樹, 竹之下誠一, 和栗聡: ヒト大腸癌由来細胞株における Dipeptidase-1 (DPEP1) の局在解析. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013年3月28-30日: サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県・高松市)

永井千晴, 植村武文, 山本雅哉, 澤田直樹, 竹之下誠一, 和栗聡: ヒト大腸癌細胞株における Dipeptidase-1 の機能局在解析. 日本解剖学会第58回東北・北海道連合支部学術集会, 2012年9月22-23日: 山形大学医学部(山形県・山形市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/home/anatomy2/achi eve.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30244908

(2) 研究分担者

植村 武文 (UEMURA TAKEFUMI)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80548925