

CD 82/KAI-1 の発現による癌浸潤転移関連蛋白の変動

丹羽 崇

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Effect of CD 82/KAI-1 on the expression of proteins involved
in the cancer invasion and metastasis.

TAKASHI NIWA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【背景・目的】

癌の浸潤・転移には、テトラスパニンの関与が報告されている。その中でもテトラスパニンファミリーである CD 82/KAI-1 が高発現している癌組織では予後が良好であることは報告されているが、癌細胞浸潤転移関連酵素の変動については未だ明らかにされていない。そこで本研究では、CD 82 の発現に伴う遺伝子の挙動をマイクロアレイでスクリーニングし、変動がみられた DPP 4 gene family とその関連分子の発現について検討を行った。

【材料・方法】

CD 82 低発現細胞株であるヒト非小細胞肺癌の h 1299 細胞に CD 82/KAI-1 を遺伝子導入した h 1299/CD 82 transfectant を用いた。CD 82 による遺伝子の挙動をマイクロアレイで網羅的に解析し、DPP 4 gene family の変動は Real-time PCR, ウェスタンブロット法で検討した。酵素活性はグリシルプロリンメチルクマリンアミドを用いた Nagatsu らの方法で蛍光測定し、細胞の局在は免疫蛍光染色法で検討した。

【結果・考察】

1. CD 82 遺伝子導入による mRNA の挙動

Real-time PCR による解析では、h 1299/CD 82 細胞の CD 82 mRNA は、h 1299/Zeo 細胞に比べ約 55 倍の発現を認め、ウェスタンブロット法に

おいても h 1299/CD 82 細胞に CD 82 蛋白の強い発現を認めた。CD 82 の遺伝子導入による mRNA の挙動はマイクロアレイの解析では、h 1299/CD 82 細胞は、テトラスパニン 7, 6 の他、蛋白質分解酵素である DPP 4 と結合する Caveolin-1 が高発現していた。一方、MMP 1, MMP 10 のほか、アクチン結合蛋白である actinin alpha 4 や DPP 4 gene family である DPP 9 の発現が減少していた。

2. CD 82 の発現による Caveolin-1, β -catenin の挙動

h 1299/CD 82 細胞の細胞骨格蛋白分画には Caveolin-1 の発現がみられた。h 1299/Zeo 細胞に比べ h 1299/CD 82 細胞の核蛋白分画の β -catenin 量はわずかに低下していたが細胞膜蛋白分画では著明な増加がみられた。

3. CD 82 の発現による DPP 4 gene family の変動

DPP 4 と DPP 8 mRNA の発現に明らかな変化はみられなかったが、h 1299/CD 82 細胞の DPP 9 mRNA は、h 1299/Zeo 細胞の 1/3 に減少していた。Whole cell 蛋白を用いたウェスタンブロット法では、DPP 9 蛋白の減少が確認された。

4. 細胞抽出分画における DPP 4 gene family の発現

h 1299/Zeo 細胞に比べ h 1299/CD 82 細胞の細

胞膜での DPP 4 は高発現し, DPP 9 は細胞膜蛋白分画でわずかに減少した. h 1299/CD 82細胞の DPP 9 は細胞骨格蛋白分画で発現がみられた. DPP 8 では著しい変化はみられなかった.

5. 細胞抽出蛋白分画における DPP 9 の発現

h 1299/CD 82細胞では, 細胞膜と核分画における DPP 9 の発現が減少し, N 末端領域を認識する抗体と触媒領域を認識する抗体で DPP 9 が細胞骨格分画に強い発現がみられた.

6. CD 82の発現による DPP 9 と Caveolin-1の局在の変動

DPP 9 と Caveolin-1の局在を免疫蛍光染色法で検討した. Caveolin-1は h 1299/Zeo 細胞では細胞膜を中心として分布し, 細胞質にもわずかに発現がみられたが, h 1299/CD 82細胞では細胞質全体に強く発現していた. PE 標識抗 DPP 9 抗体で染色された DPP 9 は, h 1299/Zeo 細胞の細胞膜に存在し, 細胞質にも弱く発現がみられたが, h 1299/CD 82細胞では細胞膜における発現は低下し, 細胞質においても弱く発現がみられた.

7. 酵素活性の測定

Whole cell 抽出蛋白の酵素活性は, CD 82導入株では有意に高値を示した ($p < 0.05$). 培養細胞膜表面の DPP 活性を蛍光測定したところ, h 1299/CD 82細胞の DPP 4 活性は h 1299/Zeo 細

胞の約 2 倍の活性を示したが, 培養上清中の活性に有意な差は認められなかった.

【結論】

癌細胞は CD 82の発現により, 細胞間接着の安定化と DPP 4 gene family の発現変動が生じ, 細胞遊走が阻止される形質を獲得すると考えられた. CD 82の発現に伴う DPP 4 gene family の発現変動は, 細胞間接着に変化をもたらす CD 82の癌転移抑制遺伝子としての機能の一つであると考えられた.

【文献】

- 1) Takahashi M, Sugiura T, Abe M, Ishii K and Shirasuna K (2007) Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD 82 affects cancer cell migration. *Int J Cancer* **121** : 1919-29.
- 2) Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S and Monden M (1996) E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* **77** : 1605-13.
- 3) Abe M, Sugiura T, Takahashi M, Ishii K, Shimoda M and Shirasuna K (2008) A novel function of CD 82/KAI-1 on E-cadherin-mediated hemophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Lett* **266** : 163-70.
- 4) Olsen C and Wagtmann N (2002) Identification and characterization of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidase IV. *Gene* **299** : 185-93.