

# 高谷 義博 論文内容の要旨

主 論 文

## New separation method of subpopulations from a heterogeneous colon cancer cell line

ヘテロな表現型を有する大腸癌細胞株におけるサブポピュレーションの新規分離法

高谷義博、田中邦彦、平川稚麻、田川泰、丹羽正美

Anticancer Research (in press) 2008

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：丹羽正美教授)

### 緒 言

大腸癌細胞における遺伝子の heterogeneity は詳細に解析されているが、表現型の heterogeneity に関する報告は少ない。従来、細胞集団からのサブポピュレーション分離には、限界希釈法、クローニングシリンダーによる単離、フローサイトメトリー法などが利用されているが、特別な機器や抗体を必要とする。我々は、大腸癌細胞株より表現型の異なるサブポピュレーションを分離するための有用かつ簡便な方法を確立したので報告する。

### 対象と方法

ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 を用いた。DLD-1 のサブポピュレーションの分離は以下の如く実施した。8  $\mu$ m ポアを有するケモタキセルの膜上に DLD-1 を  $1 \times 10^5$  個播種し、6 時間培養後、ポアを通過し裏面に接着した細胞を剥離し培養した。ポアを通過し、培養容器の底面に落下した細胞も同様に培養し、形態的に評価した。これらのサブポピュレーションのタイトジャンクション (TJ) を評価する為に、トランスウェルに培養した単細胞層を用い、経上皮電気抵抗値 (TEER) を測定した。TJ 蛋白の mRNA 発現を RT-PCR 法により、またタンパク発現を免疫細胞化学染色により確認した。

### 結 果

DLD-1 サブポピュレーションの分離；ポアを通過し裏面に接着した細胞は、扁平な形態を示し、細胞同士が密に結合していた。一方、ポアを通過し培養容器の底面に落下した細胞は膨隆した形態を示し、細胞間結合が疎であった。以前の報告より、形態的に膜の裏面に接着した細胞は clone D、底面へ落下した細胞は clone A と同定した。

TEER 測定 ; 14 日目の clone D の TEER は  $147 \pm 1.4 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$ 、clone A の TEER は  $12 \pm 0 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$  であり、clone D の TJ は clone A よりも有意に強固であった。

クローディングファミリーの mRNA 発現解析 ;

DLD-1 細胞では claudin-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 15, 17, 19, 20 及び 23 は普遍的に発現していた。Clone D 及び A の間で、claudin-2, 3, 4, 7, 12, 14 の mRNA 発現に定性的な差異を認めた。

免疫細胞化学的解析 ; Clone D では claudin-1, 2, 3, 4, 5 及び 12 が細胞膜・細胞質・核のいずれの部位でも観察され、claudin-7 は主に膜上に発現していた。Claudin-6 と -8 は主に核に発現し、膜での発現は見られなかった。clone A では、claudin-1, 2, 3, 5, 6, 8, 12 が核・細胞質に点状に発現し、claudin-4 と 7 は核周囲と細胞質に発現していた。いずれも細胞膜への分布はわずかであった。ZO-1 は clone D では核以外の主に細胞膜に線状に発現していたが、clone A では、核以外の部位に点状に発現していた。

## 考 察

元来、これら 2 種類のクローンは形態的差異により分離されたものであるが、我々の方法では、clone D は clone A よりも膜面に対し接着しやすく、遊走能が劣っていることが明らかとなった。その他のアッセイ系により、clone A は clone D に比し、有意に浸潤能が高いことも確認している。Clone A は “leaky” な TJ を、clone D は “tight” な TJ を形成しており、当研究は単一細胞株から分離した 2 つのサブクローンにおいて TEER の違いを証明した最初の報告となる。免疫細胞化学的解析では、clone D の TJ の形成には、少なくとも claudin-2, 3, 4, 5, 7, 12 が機能しているが、clone A において、クローディングの細胞膜側での機能的な発現は見られず、これは膜側への ZO-1 集積の欠如が一因と考えられた。我々の方法において、clone D と A の相違は、細胞が  $8 \mu\text{m}$  ポアを有する膜の裏面から落下したか否かであった。すなわちこの方法による細胞の選択性は、膜からの遊離の程度と足場非依存性の増殖に依存しており、これらは同法において、表現型として異なるサブポピュレーションを分離する際の重要な規定因子となっていると考えられた。以上、細胞間結合の異なる大腸癌細胞株のサブポピュレーションを分離する方法を新規に開発した。同法は簡便で、大腸癌の heterogeneity を解析するのに有用なツールと考えられた。