

## IB-27

レチノイン酸による E-カドヘリン発現調節の免疫電顕による解析

畠山節子<sup>1)</sup>、石田 欣二<sup>2)</sup>、三上俊成<sup>1)</sup>、佐藤方信<sup>1)</sup>  
岩手医科大学 <sup>1</sup>歯学部 口腔病理学、<sup>2</sup>バイオイメ  
ージングセンター

【目的】レチノイン酸は表皮細胞の増殖と分化の調節に必須の因子である。我々はマウス歯肉上皮細胞株 (GE1) を用いて、レチノイン酸がサイトケラチンとデスモグレインの mRNA 発現を顕著に抑制し、レチノイン酸処理によってデスモゾームが消失することを、透過型電顕と RT-PCR で明らかにした (Hatakeyama 2004)。今回、GE1 細胞を用いて、レチノイン酸による adherens junction の構成分子である E-カドヘリンの発現の調節を免疫電顕、ウェスタンブロット、および RT-PCR にて解析した。同時に desmoglein 1&2 に対する免疫電顕も行った。【方法】GE1 細胞は通常の培養条件で約 2 週間培養すると重層化する。G1 細胞をペトリ皿内に置いたアクアフィルム上で培養し、細胞が重層した後、all *trans*-retinoic acid (*at*-RA, Sigma, aldrich) を 1  $\mu$  M 濃度で培地 (SFM101 + 1% EGF + 1% fetal calf serum) に添加してさらに 5 日間~10 日間培養を続けた。免疫電顕および RT-PCR を行い、E-カドヘリン発現の変化を検討した。*at*-RA を含まない培地で培養した GE1 細胞を対照として同様のことを行った。【結果】対照の GE1 細胞は 5~6 層に重層しデスモゾーム構造がよく形成され、同部位に desmoglein 1&2 に結合した金コロイドがみられた。一方、1  $\mu$  M 濃度の *at*-RA 処理細胞ではデスモゾームはほぼ完全に消失し、金コロイドは消失した。一方、E-カドヘリンについては、RT-PCR にて *at*-RA 処理細胞の mRNA 発現は対照細胞に比べて有意に増加した。免疫電顕においては E-カドヘリンに結合した金コロイドの細胞膜への結合が対照細胞に比べて増加を示す所見が得られた。【考察】*at*-RA は E-カドヘリン発現を亢進させ adherens junction の形成を促す可能性が示唆された。

## IB-28

TWIST 遺伝子の発現と E-cadherin の分布

伊藤金次、石川由起雄  
東邦大学医学部病理学講座

【目的】TWIST 遺伝子は basic-helix-loop-helix 構造をもつ転写因子で、初期胚葉の発生に関わることが知られている。近年、本遺伝子が E-cadherin の発現に関連し、癌の転移に重要な役割をしていることが報告された。我々は、TWIST 遺伝子と E-cadherin の発現機構を解析するためにヒト大腸癌 SW480 細胞に TWIST 遺伝子を強制発現させ、E-cadherin の発現動態を観察した。

【方法】TWIST 遺伝子の全長を green fluorescent protein(GFP)ならびに pFLAG-CMV の発現ベクターに組み込み後、SW480 大腸癌細胞に移入させ、融合蛋白を発現させた。TWIST と E-cadherin の発現は共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。また、TWIST 遺伝子の断片を GST 融合蛋白として合成し、これを抗原としたウサギポリクロナール抗体作成し、western blot 並びに蛍光抗体法に使用した。

## 【結果および考察】

共焦点による観察により、GFP—TWIST 融合蛋白と今回作成した TWIST 抗体の免疫染色による蛋白の分布は一致した。SW480, Caco2 細胞の TWIST 分布は細胞質と核、両者に分布したが、細胞質に多くの分布を示し、核のみに限定した局在は少なかった。TWIST の分布が核に多い細胞は E-cadherin の細胞膜の局在が減少、ないしは認められない細胞も散見されたが、多くの細胞は E-cadherin の局在性変化は見られなかった。一過性強制発現の実験系では western blot によっても E-cadherin down regulation は確認されなかった。TWIST が E-cadherin などの細胞間接着発現を抑制することは多くの報告により知られている。しかし、我々は TWIST が発現しているにもかかわらず、E-cadherin の分布は基本的には変化なく、細胞間接着も維持されていることを観察した。このことは TWIST の局在に起因すると考えられた。また、細胞質の TWIST の局在は、活性制御機構が存在していることが示唆された。