

Title	口腔扁平上皮癌細胞における α -enolaseの機能の解析
Author(s)	池田, 朋子
Journal	, (): -
URL	http://hdl.handle.net/10130/2971
Right	

平成 23 年度卒業論文

口腔扁平上皮癌細胞における α -enolase の
機能の解析

117 期生

13 番 池田 朋子

【指 導】

臨床検査病理学講座：村松 敬 准教授

生化学講座 ：佐藤 裕 准教授

目 次

1. 要 約
2. 材料および方法
3. 結 果
4. 考 察
5. 謝 辞
6. 参考文献
7. 付 図

要 約

α -enolase は正常細胞における解糖系酵素の 1 つである。Enolase の組織特異的アイソフォームであり、胚細胞やほとんどの成体細胞に発現する。現在、口腔扁平上皮癌細胞において α -enolase が癌発生に関わっていることが明らかになっている。しかしながら、 α -enolase が口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす細胞増殖能、周囲組織への浸潤能、細胞運動能などの癌細胞特有の機能は解明されていないので、本研究では、 α -enolase が口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖能に関与するかどうかを調べるため、 α -enolase 発現ベクターを構築し、 α -enolase 発現の低い口腔扁平上皮癌細胞にトランスフェクションして培養し、24 時間毎の遺伝子導入細胞と mock 細胞の細胞増殖数を比較した。その結果、遺伝子導入細胞は mock 細胞に比べ、細胞数が有意差を持って高くなるのが認められ、 α -enolase は口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖能に影響することが示唆された。

緒 言

Enolase(別名ホスホピルビン酸ヒドラターゼ)とは解糖系において2-ホスホグリセリン酸とホスホエノールピルビン酸の相互変換を触媒する酵素である。**Enolase**には、 α 、 β 、および γ の3つのサブユニットがあり、別々の遺伝子によってコードされる。これらは5つの異なったアイソザイム($\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$)を持つ。**Enolase**の哺乳類、鳥類に発現する3つの主要な組織特異的アイソフォームは $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ である。 $\gamma\gamma$ はニューロン特異的エノラーゼ(NSE)とも呼ばれ、特に神経に発現する。 $\beta\beta$ は筋肉特異的エノラーゼ(MSE)とも呼ばれ、横紋筋に発現する。 $\alpha\alpha$ は非ニューロン特異的エノラーゼ(NNE)とも呼ばれ、胚細胞や他の成体細胞に発現する。 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ はヒト遺伝子座位にてそれぞれ*ENO1*、*ENO3*、*ENO2*と名付けられている。(1)(2)

Enolaseは正常細胞において解糖系酵素の1つとしての機能を有し、前述した細胞にそれぞれ発現しているが、これまでの研究にて、いくつかの腫瘍の血清中や病変で特異的な高発現することが報告されており、診断や治療効果の評価において重要な役割を果たしている。

NSE(γ -enolase)は神経芽細胞腫、褐色細胞腫、肺小細胞癌などの腫瘍マーカーとしてそれら腫瘍の診断、治療効果の判定に用いられている(8)。

α -enolaseは腫瘍発生に潜在的役割を果たすとみなされている。周囲の正常組織より高い代謝率を有する癌細胞において**Enolase**は細胞の代謝に重要な因子と考えられている。一方、 α -enolaseが癌の浸潤と転移に関係しているとするいくつかの報告がある(5)。また、 α -enolaseの自己抗原がNSCLC患者から同定され、その過剰発現は腫瘍の再発、死亡といった予後の悪さと関係している(6)。口腔扁平上皮癌においては、口腔扁平上皮癌患者の全唾液で特異的に出現を認め

る既知のタンパク質として二次元電気泳動法と peptide-massfingerprinting 法によって α -enolase が同定され、 α -enolase は唾液中に出現する口腔扁平上皮癌のバイオマーカーとして有用性があると示唆されている⁽¹⁾。さらに、 α -enolase をコードする *ENO1* 遺伝子の転写物を免疫組織学的手法により正常口腔上皮と口腔扁平上皮癌の組織切片を免疫組織化学的検査によって調査し、ヒト正常口腔上皮と口腔扁平上皮癌での遺伝子転写物の異なる分布が証明され、*ENO1* 遺伝子が口腔上皮の癌発生と関係があることが明らかになっている⁽⁴⁾。

しかしながら、口腔扁平上皮癌細胞のもつ細胞増殖能、周囲組織への浸潤能、細胞運動能など癌細胞特有の機能⁽⁷⁾に α -enolase がどのように関与しているのか明らかになっていない。そこで、本研究では癌細胞の特性のなかの細胞増殖能に着目し、 α -enolase が口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖能に関与するかどうかを調べるため、*ENO1* 遺伝子を持つ真核細胞発現ベクターを構築し、これを α -enolase 発現の低い口腔扁平上皮癌細胞にトランスフェクションし、形質移入細胞と mock 細胞の細胞増殖とを比較することによって検索した。

材料および方法

1. α -enolase 発現ベクターの構築

A. 試料

実験にはヒト口腔扁平上皮癌由来細胞の SAS(Japanese Cancer Research Resources Bank)を用いた。

B. 細胞の培養と RNA の抽出

細胞は 100mm ディッシュで、ペニシリン-ストレプトマイシン(100U/ml, Invitrogen)含有 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Invitrogen)に 10%仔牛血清(Sigma-Aldrich)を加えた培養液にて 37°C、5%CO₂の環境下で培養した。細胞がコンフルエントになった状態から、RNA を抽出した。Trizol (Invitrogen)を用いてホモジナイズし、クロロホルム(Wako)にて RNA を抽出した。抽出した RNA は DEPC-Water 50 μ l にて溶解し、NanoDrop1000(Thermo Fisher Scientific)を用いて純度、濃度を測定した。

C. *ENO1*cDNA の合成

OD₂₆₀/OD₂₈₀ の値が 1.92 で 2512.9ng/ μ l を示した RNA を鋳型にして逆転写反応を行い、cDNA を合成した。逆転写反応には Reverse Transcription Reagents(ABI)を使用した。DEPC-water 38.1 μ l、10X RT Buffer(1X) 10 μ l、MgCl₂(5.5mM)22 μ l、オリゴ dT プライマー(2.5 μ M) 5 μ l、dNTPs (500 μ M each)20 μ l、RNase inhibitor(0.4U/ μ l) 2 μ l、と逆転写酵素(1.25U/ μ l)2.5 μ l、RNA 0.4 μ l の組成からなる反応液を調製し、25°C10 分間、48°C30 分間、95°C

5分間を MJ Research PTC-100 Thermal Cycler(MJ Research)を用いて逆転写反応させて cDNA を得た。作成した cDNA を鋳型として、PCR 法にて α -enolase 発現遺伝子である *ENO1* の増幅を行った。PCR 増幅には表-1 に示す塩基配列のプライマーと Advantage^(R)2 PCR Kit (Clontech)を用いて、精製水 35 μ l、10X Advantage 2 SA PCR Buffer 5 μ l、50X dNTPs(2mM each) 5 μ l、ENO1 プライマー(10 μ M)各 1 μ l、50X Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech) 1 μ l、cDNA(40ng/ μ l) 2 μ l の組成からなる反応液を調製し、95°C1分間、95°C30秒間と 72°C1分間を 5 サイクル、95°C30秒間と 67°C1分間を 30 サイクルの増幅反応を MJ Research PTC-100 Thermal Cycler(MJ Research)を用いて行った。PCR 後、PCR 産物を 2 μ l 取り、loading dye と混和して 1%アガロースゲルにアプライして電気泳動を 20 分間行い、10mg/ml Ethidium bromide による染色後、UV トランスイルミネーターを用いて *ENO1*cDNA の増幅を確認した。その後、PCR 産物は PureLink^(R) PCR Purification Kit(Invitrogen)を用いて付属のプロトコールに従って精製した。

D. *ENO1*cDNA を含む真核細胞発現ベクターの構築

1) 原核細胞発現ベクターへのサブクローニング

図-1に示す原核細胞発現ベクターである pBAD202/D-TOPO^(R)(Invitrogen)を用い上記PCR産物である *ENO1*cDNA とリガーゼ反応を行い、大腸菌を形質転換した。リガーゼ反応は、*ENO1*cDNA 4 μ l、pBAD202/D-TOPO^(R)(Invitrogen) 1 μ l、Salt Solution 1 μ l を混和し、室温(22~23°C)で5分間インキュベートした。リガーゼ反応液で One Shot^(R)TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) に形質転換した。その方法は TOP 10 と作成したベクター 2 μ l を混合し氷上で30分間インキュベートした後、ヒートショックを 42°C30秒間で行い、SOC培

地250 μ lを加え1時間インキュベートした(200 rpm、37°C)。その後カナマイシン50 μ g/ml含有LB寒天培地に菌液を塗布し37°Cにて一晩培養を行った。目的とするクローンを選択するためのPCR反応はGoTaq^(R)Flexi DNA Polymerase (Promega) を用いて各コロニーにつき20 μ lの反応液を5X Green GoTaq^(R) Flexi Buffer(Promega) 4 μ l、MgCl₂ Solution(25mM)1.2 μ l、dNTP(10mM each) 2 μ l、プライマー各0.4 μ l、GoTaq^(R)Flexi DNA Polymerase(Promega) 0.2 μ l、精製水11.8 μ lの組成で調製し、95°C2分間、95°C30秒間と50°C30秒間と72°C1分30秒間を25サイクル後、72°C2分30秒間の増幅反応を行った。増幅産物は電気泳動で確認し、目的のクローンを選択した。得られた目的のクローンからプラスミドを抽出、精製した。

2) 真核細胞発現ベクターへ導入するPCR増幅

上記精製プラスミドを鋳型として新たなプライマーを用いてPCR増幅を行い、インフレームでV5エピトープ領域を含む*ENO1*DNAを作成した。使用したプライマーは表-2に示す。このPCRはKOD -Plus-(TOYOBO) DNAポリメラーゼを用いて行った。反応液組成は、鋳型DNAとして上記で選択されたプラスミド(5ng/ μ l) 1 μ l、KOD -Plus- 用Buffer(TOYOBO) 5 μ l、MgSO₄ Solution (25mM)2 μ l、dNTP(2mM each) 5 μ l、プライマー各1 μ l、KOD -Plus- DNAポリメラーゼ (1U/ μ l) 1 μ l、製水35 μ lの組成で調製し、95°C1分間、95°C30秒間と72°C1分間を5サイクル、95°C30秒間と68°C1分間を30サイクルの増幅反応を行った。得たPCR産物は前述と同様にして電気泳動にて増幅を確認し、精製を行った。

3) 真核細胞発現ベクターへのクローニング

前記増幅断片を制限酵素 *Bam*H I にて切断し、図-2に示す真核細胞発現ベクターである pEF1/V5-HisA(Invitrogen)の制限酵素 *Bam*H I、*Pme* I にて切断したサイトに挿入して目的とするプラスミドを構築した。PCR増幅断片と pEF1/V5-HisAのリガーゼ反応液はT4DNAリガーゼを用い、一晩反応させた後、One Shot[®] INV α F' Competent Cells(Invitrogen)に形質転換し、アンピシリン 100 μ g/ml含有LB寒天培地にて培養し、組み換えベクター導入コロニーを前述のPCRを用いた方法および電気泳動にて選択したのち、アンピシリン100 μ g/ml含有LB液体培地にて形質転換された菌株を培養した。

2. 口腔扁平上皮癌由来細胞へのトランスフェクション

A. 定量的リアルタイム PCR による *ENO1* 遺伝子 mRNA の測定

実験にはヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 Ca9-22、SAS(Japanese Cancer Research Resources Bank)、BSC-OF(北海道医療大学歯学部、安彦義裕教授より供与)⁽¹¹⁾を用いた。各細胞は 100mm ディッシュで、ペニシリン-ストレプトマイシン(100U/ml, Invitrogen)含有 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Invitrogen)に 10%仔牛血清(Sigma-Aldrich)を加えた培養液にて 37°C、5%CO₂の環境下で培養した。各細胞から前述の方法で RNA を抽出し、cDNA を逆転写反応により合成した。定量的リアルタイム PCR 法は、作成した cDNA を鋳型として、プライマーは human *ENO1*(Hs00361415_m1, Applied Biosystems)、human *GAPDH*(4326317E, Applied Biosystems)を使用し、TaqMan[®]Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて A BI 7500 Fast (Applied Biosystems)にて、添付のプロトコールに従って行った。*ENO1* mRNA

の発現量は GAPDH を内部基準として、比較 C_t 法で求め、最も *ENO1* mRNA の発現が少ない細胞をトランスフェクションする細胞として選択した。統計学的有意差は Mann-Whitney's U-test で検定した。

B. トランスフェクション

ネオマイシン耐性遺伝子を持つ pZDSB とインサートを含まない空のベクターを Nucleofector™ II 用試薬キットを用いて Nucleofecto™ II Device(Wako) にて、添付のプロトコールに従って、エレクトロポレーション法により *ENO1* mRNA 発現が最も少ない細胞へ導入した。反応後の懸濁液を 35mm ディッシュでネオマイシン(Geneticin[®], GIBCO, 400 μ g/ml)添加 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Invitrogen)に 10%仔牛血清(Sigma-Aldrich)を加えた培養液にて 37°C、5%CO₂ の環境下で 2 週間以上培養し、トランスフェクトされた細胞を選別した。

C. Western blot による遺伝子導入の確認

pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞と対照となる mock 細胞の遺伝子発現は Western blot により pZDSB に設計されている V5 エピトープにて確認した。まず、pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞と mock 細胞よりタンパクを抽出し Ultrospec 3000 pro UV/Visible Spectrophotometer(Pharmacia Biotech)を用いてタンパク濃度を求め、その値より同濃度となる Western blot のための抽出物サンプルを調製した。次に、サンプル各 50 μ g を 10%SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写した。膜を洗浄後、3%スキムミルク/TBS-T でブロッキングした。その後、1 次抗体として Anti-V5 Antibody(1:5000,Invitrogen)、Anti-Actin antibody

(1:2000,SIGMA)を4°Cにて一晩反応させた。洗浄後、2次抗体として Anti-mouse IgG、Anti-rabbit IgG(1:1000 each,Amersham Biosciences)を室温で1時間反応させた。検出には ECL detection kits(GE Healthcare)を用いて、試薬を洗浄後のメンブレンに作用させた後、エックス線フィルムに感光させ、フィルムを現像して可視化した。

3. 細胞増殖能の測定

pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞、mock 細胞を 2.5×10^4 個ずつ 35mm ディッシュに播種し、24時間毎に 0.05%Trypsin-EDTA(Invitrogen)にて細胞を剥がし、Coulter Counter(Beckman Coulter)にて細胞数を計測した。pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞、mock 細胞間の増殖した細胞数の有意差は Mann-Whitney's U-test で統計学的に検定した。

結 果

1. *ENO1cDNA* を含む真核細胞発現ベクターの構築

当初PCR産物を真核細胞発現ベクターpcDNA3への導入を試みたが、目的とするプラスミドを持つ大腸菌クローンが得られなかった。PCR産物が大腸菌で発現し、大腸菌に対して毒性を持ったため、目的とするクローンが得られなかったのかもしれない。

そこでまず、図-1に示す原核生物発現ベクターである pBAD202/D-TOPO[®](Invitrogen)を使用して、V5エピトープ領域を含む *ENO1cDNA* を作成した。ベクター側の突出末端に結合したトポイソメラーゼ I (TOPO)は、PCRのENO1Fプライマーの5'末端に付加されている"CACC" の4塩基を認識し、その相補鎖の "GGTG" を切り出してベクターとPCR産物を結合させ、ベクターの平滑末端のTOPO は、PCR産物の平滑な3'末端と結合し、方向性をもってPCR産物がクローニングされる。pBAD202はカナマイシン耐性遺伝子を有するので、形質転換後、カナマイシン含有LB寒天培地に形成されたコロニーから組換えベクターが導入されているコロニーを選択するためコロニーを直接鋳型として用いたPCR増幅を行った。増幅産物の電気泳動で *ENO1cDNA* のバンドが確認できたコロニーのみをカナマイシン含有LB液体培地に継代し16時間培養した。培養液からアルカリSDS法によりベクターを抽出し、20%ポリエチレングリコール(2.5N・NaCl)により精製した。このプラスミドには上記PCR産物が正しい方向で正しいサイズで挿入されていたので、このベクターを pZDQ8と命名した。pZDQ8は原核生物のベクターであるので、次のステップとしてpZDQ8を鋳型として新たなプライマーを用いてPCRを行い、真核細胞における挿入した遺伝子の発現を確認するためにV5エピトープを含む *ENO1cDNA*

を作成した。制限酵素 *BamH* I にて切断したPCR産物を、制限酵素 *BamH* I、*Pme* I にて切断したpEF1/V5-HisA(Invitrogen)へ導入した。pEF1/V5-HisAはアンピシリン耐性遺伝子を有するので、形質転換した後、アンピシリン含有LB寒天培地にて培養し、組み換えプラスミド導入コロニーを前述のPCRを用いた方法にて選択したのち、アンピシリン含有LB液体培地にて形質転換された菌株を培養し、前述の方法でプラスミドDNAを抽出し精製した。このプラスミドをpZDSBと命名し、以後の実験に供した。

2. *ENO1* 遺伝子 mRNA の測定

ENO1 遺伝子 mRNA の発現量を図-3 に示す。Ca9-22、SAS、BSC-OFのうち、Ca9-22 が最も発現量が少なかった。最も少ないCa9-22の *ENO1* 遺伝子 mRNA 発現量を 1 とした時、SAS での発現量は約 4 倍、BSC-OF での発現量は約 5 倍の値を示した。よって、発現量の最も少なかった Ca9-22 に pZDSB のトランスフェクションを行った。

3. Western blot による遺伝子導入の確認

Western blot の結果を図-4 に示す。pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞において、pZDSB に存在する V5 エピトープ陽性のバンドを示す、そのサイズは *ENO1* と V5 エピトープの融合タンパク質に相当する約 50kDa のバンドが認められた。V5 はインサートを挿入することで発現するため、pZDSB がトランスフェクションされた Ca9-22 には発現したが、空のベクターをトランスフェクションした mock 細胞とトランスフェクションを行っていない Ca9-22 には V5 のバンドは認められなかった。アクチンはすべての細胞で均一なバンドが認められた。

4. 細胞増殖能の測定

細胞増殖能の測定の結果を図-5(A)(B)に示す。(A)より、培養して1日、2日後では pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞と mock 細胞で細胞数の有意差は認められなかったが、3日、4日、5日後では、pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞は mock 細胞に比べ、細胞数が有意差を持って高くなるのが認められた($p < 0.01$)。(B)より、グラフの傾きで示される増殖速度は pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞のほうがやや大きかった。

考 察

α -enolaseは正常細胞において解糖系酵素の1つとしての機能を有するEnolaseの組織特異的アイソフォームとして知られ、近年では α -enolaseの過剰発現は頭頸部癌の予後の深刻さとの関連があることや、癌細胞への形質転換を α -enolaseが媒介すること指摘されている⁽¹⁰⁾。さらに、 α -enolaseは口腔扁平上皮癌患者の全唾液から特異的に出現するという報告がある⁽¹⁾。しかしながら、 α -enolaseが口腔扁平上皮癌細胞における癌細胞の増殖能、浸潤能、運動能といった機能と関連するかどうかは明らかでない。

本研究では α -enolaseが口腔扁平上皮癌細胞においてどのような機能を有するかを明らかにするため、特に、 α -enolaseが口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖能に関与するかどうかを、*ENO1*遺伝子を持つ真核細胞発現ベクターを構築し、これを α -enolase発現の低い口腔扁平上皮癌細胞にトランスフェクションし、形質移入細胞とmock細胞の細胞増殖とを比較することで検証した。

実験結果より、pZDSB(*ENO1*遺伝子)導入細胞とmock細胞で比較するとpZDSB(*ENO1*遺伝子)導入細胞の細胞数が有意差を持って高くなるのが認められた。従って、 α -enolaseの発現増加により、細胞増殖が促進されたと結論した。

しかし、本研究ではCa9-22に α -enolaseが発現したかどうかはWestern blotによりV5のバンドを確認することにより行った。このことは、*ENO1*遺伝子とインフレームで結合されたV5エピトープを含むインサートが転写され、 α -enolaseに結合されたV5エピトープが発現したことをもって α -enolaseが発現したとみなしたわけであり、認められた増殖促進がインタクトに発現した α -enolaseそのものによりおこったかどうかは確認できていない。また、V5バンドの確認のみでは、pZDSB(*ENO1*遺伝子)導入細胞の*ENO1*遺伝子 mRNAのレ

ベルや α -enolase の発現量が mock 細胞と比べてどの位多かったのかもわからない。更に、Ca9-22 における α -enolase を過剰発現した場合の解析とも併せて今後検討する必要がある。

本研究により α -enolase が口腔扁平上皮癌細胞の増殖に影響することがわかった。しかしながら、本研究では増殖能の検索だけにとどまり、浸潤能、移動能に関しては α -enolase が影響を及ぼすかどうか定かではない。今後は本細胞を用いて浸潤能の検索、移動能の検索を行い、さらにノックダウンによる機能解析を行い、それらの機能と α -enolase の関連を検証する必要がある。もしこれらが証明されれば、 α -enolase が全唾液による口腔扁平上皮癌のスクリーニングや、血清濃度による口腔扁平上皮癌の進行、治療経過のモニタリングに、新しい腫瘍マーカーとして応用できるようになるだろう。

謝 辞

本稿を終えるに臨み、本研究の機会を与えていただき、終始温かいご指導を賜りました東京歯科大学臨床検査病理学講座、村松敬講師、ならびに生化学講座、佐藤裕准教授に多大なる感謝の意を捧げます。この経験に加え、得た知識はこれからの自身の基礎となり、自信になると思います。また、この論文は臨床検査病理学講座、原有沙先生の協力なくしては完成されなかったことに深く感謝の意を表します。さらに、種々ご指導、ご協力いただきました臨床病理検査学及び生化学講座の諸先生方に、心よりお礼申し上げます。

参考文献

1. Pancholi V: Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci.* Jun;58(7): 902-20, 2001
2. Peshavaria M, Day IN: Molecular structure of the human muscle-specific enolase gene (EN03). *Biochem. J;* 275: 427-433, 1991
3. 片倉朗, 作間巧, 菅原圭亮ほか: 唾液による口腔癌のスクリーニング検査
プロテオームによるバイオマーカーの解析 頭頸部癌 34: 503-507, 2008
4. Ito Satoshi, Honma Takayoshi, Ishida Kosei, et al: Differential expression of the human α -enolase gene in oral epithelium and squamous cell carcinoma. *Cancer Science* ;98: 499-505, 2007
5. Chang YS, Wu W, Walsh G, Hong WK, Mao L.: Enolase-alpha is frequently down-regulated in non-small cell lung cancer and predicts aggressive boi-

- logical behavior. Clin Cancer Res ;9(10 Pt 1) :3641-3644,2003
6. Gee-Chen Chang, Ko-Jiunn Liu, Chia-Ling Hsieh, et al: Identification of alpha-enolase as an autoantigen in lung cancer: its overexpression is associated with clinical outcomes. Clin Cancer Res;12:5746-5754, 2006
 7. 横田淳, 山本雅 編: 実験医学別冊バイオマニュアル UP シリーズ 分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール.羊土社, 1995
 8. 窪田哲朗ほか 編: 臨床検査学講座 免疫検査学第 2 版. 医歯薬出版, 2010
 9. 森谷有三英:AMP 活性化プロテインキナーゼ β 1 サブユニット遺伝子のプロモーター解析, 平成 17 年度東京歯科大学卒業論文
 10. Tsai ST, Chien IH, Shen WH,et al: ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction.Eur J Cancer;46(9):1712-23,2010
 11. Abiko Y,1997:Basaloid-squamous cell carcinoma

表-1 *ENO1* DNA 作成のために用いたプライマーの配列

	塩基数	塩基配列
ENO1 F	24	5'-CACCATGTCTATTCTCAAGATCCA-3'
ENO1 R	22	5'-CTTGGCCAAGGGGTTTCTGAAG-3'

表-2 pEF1/V5-HisAへ挿入する、V5エピトープを含む*ENO1*DNAを作成するために用いたプライマーの配列

	塩基数	塩基配列
ENOV5 R	23	5'- TTAACCGGTACGCGTAGAATCGA -3'
pBAD F	18	5'- TTCCTCGACGCTAACCTG -3'

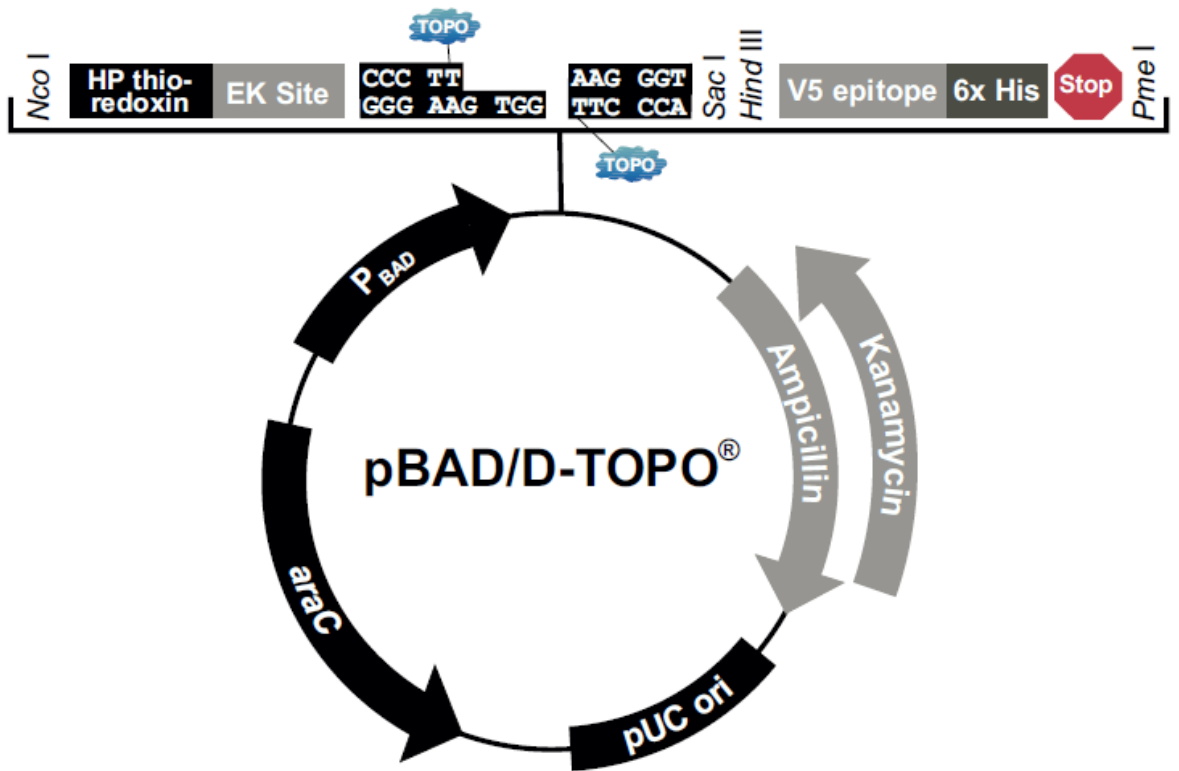


図-1 pBAD202/D-TOPO[®](Invitrogen)のplasmid map

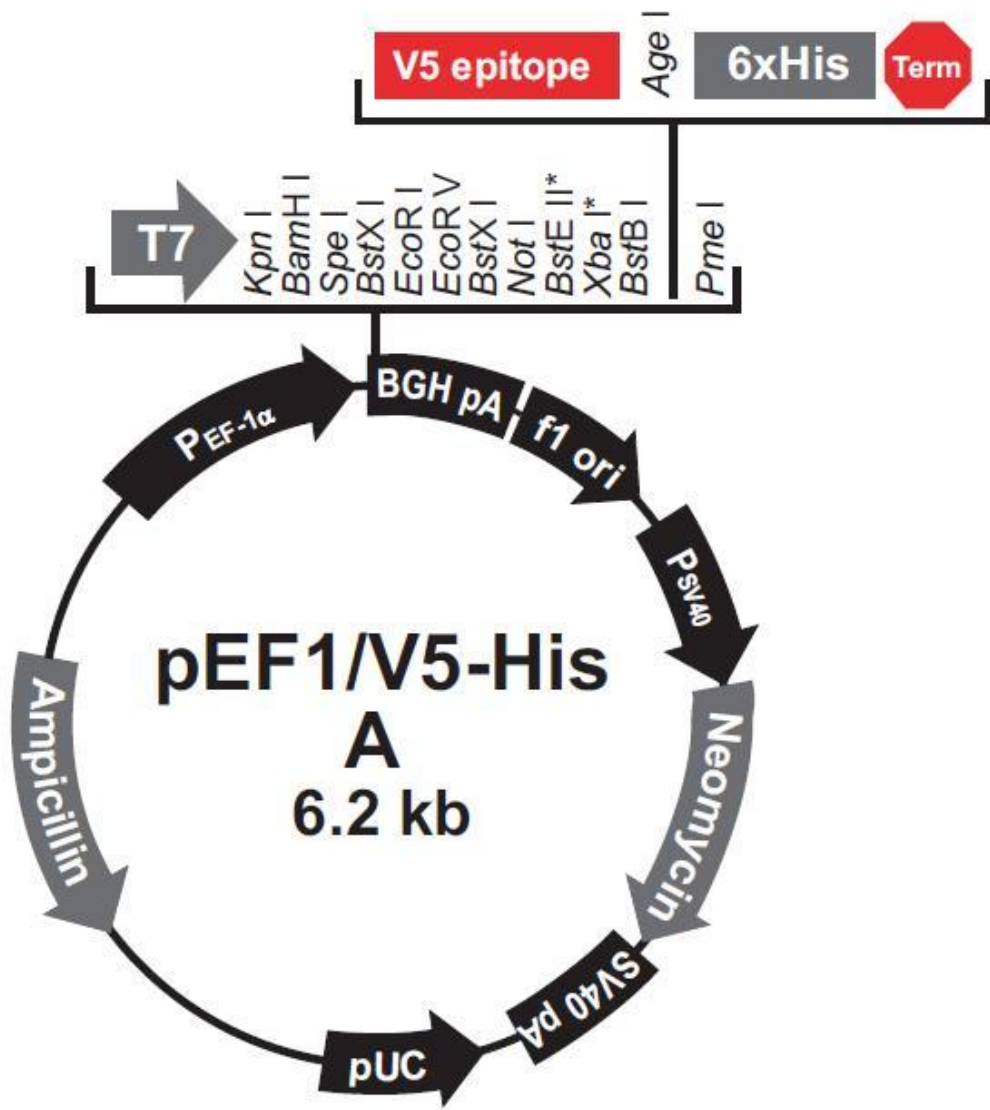


図-2 pEF1/V5-HisA(Invitrogen)のplasmid map

(fold)

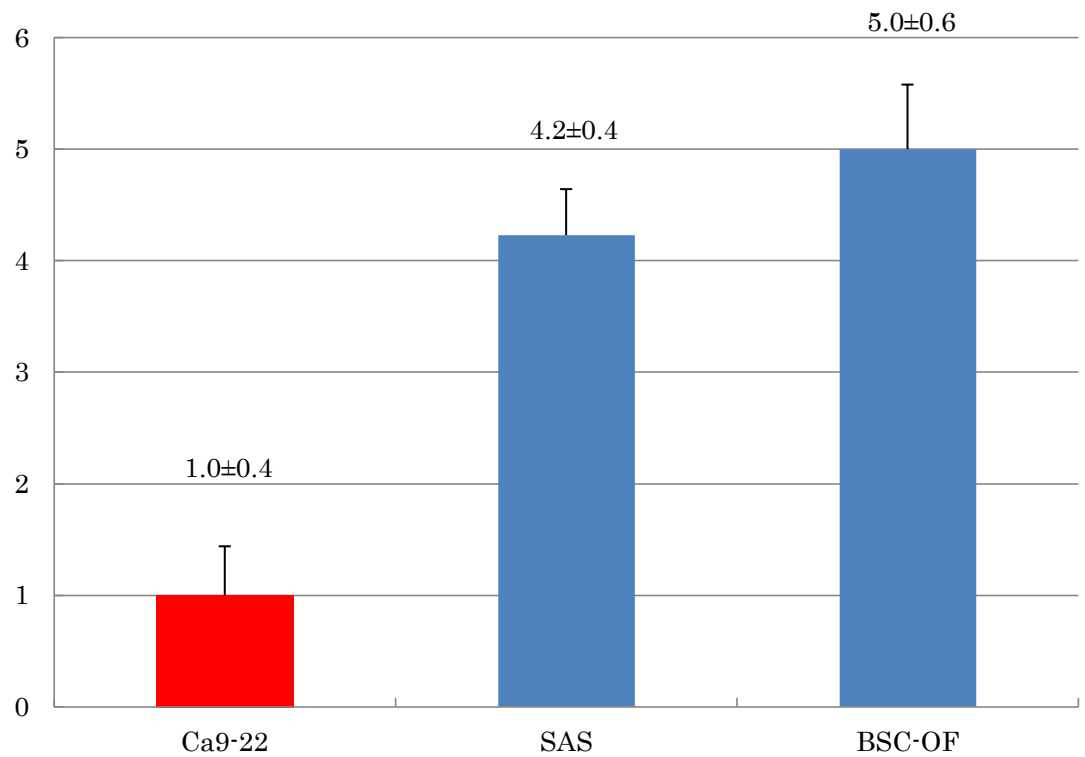


図-3 *ENO1* 遺伝子 mRNA の発現量

定量的リアルタイム PCR 法にて各細胞の *ENO1* 遺伝子 mRNA の発現量を定量した。最も発現量の少なかった Ca9-22 を 1 とした。値は平均±標準偏差。

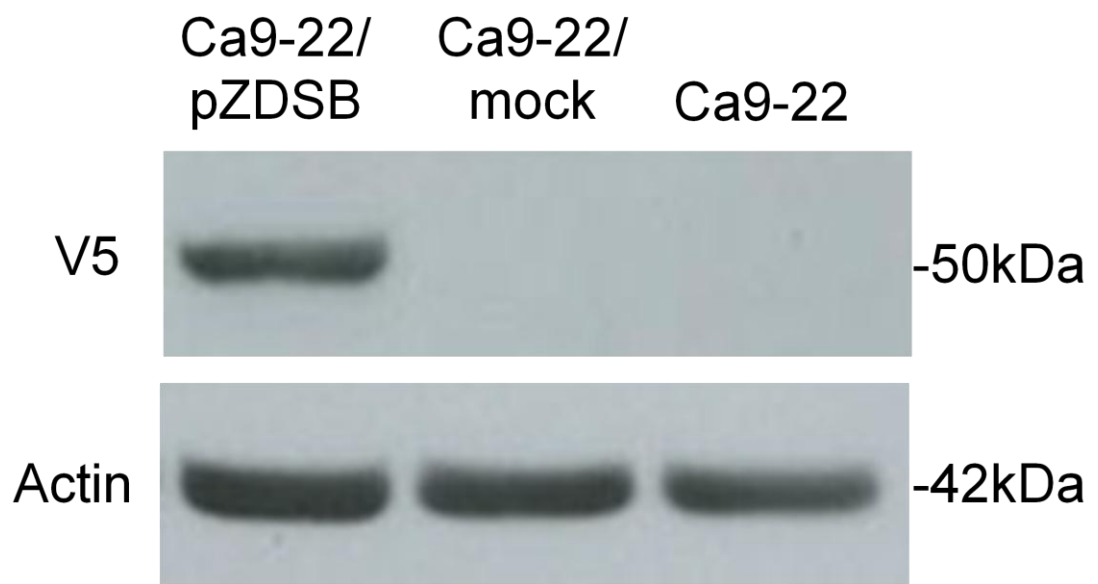


図-4 V5 エピトープとアクチンの Western blot

左から、pZDSB をトランスフェクトした Ca9-22、空ベクターをトランスフェクトした Ca9-22、トランスフェクトされていない Ca9-22 の各抗体における Western blot 像を示す。

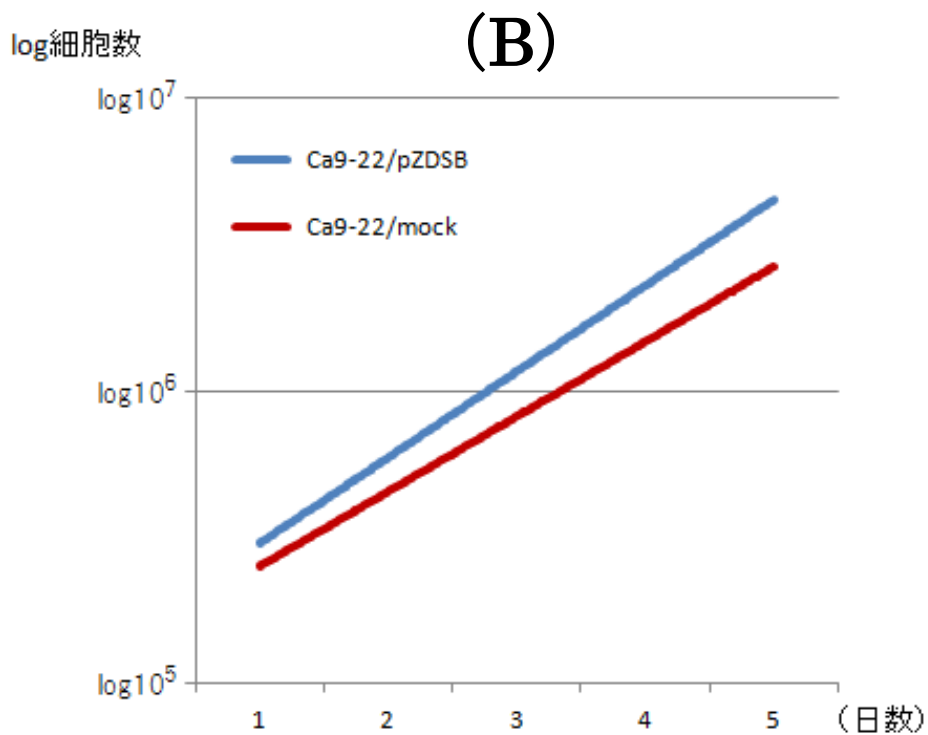
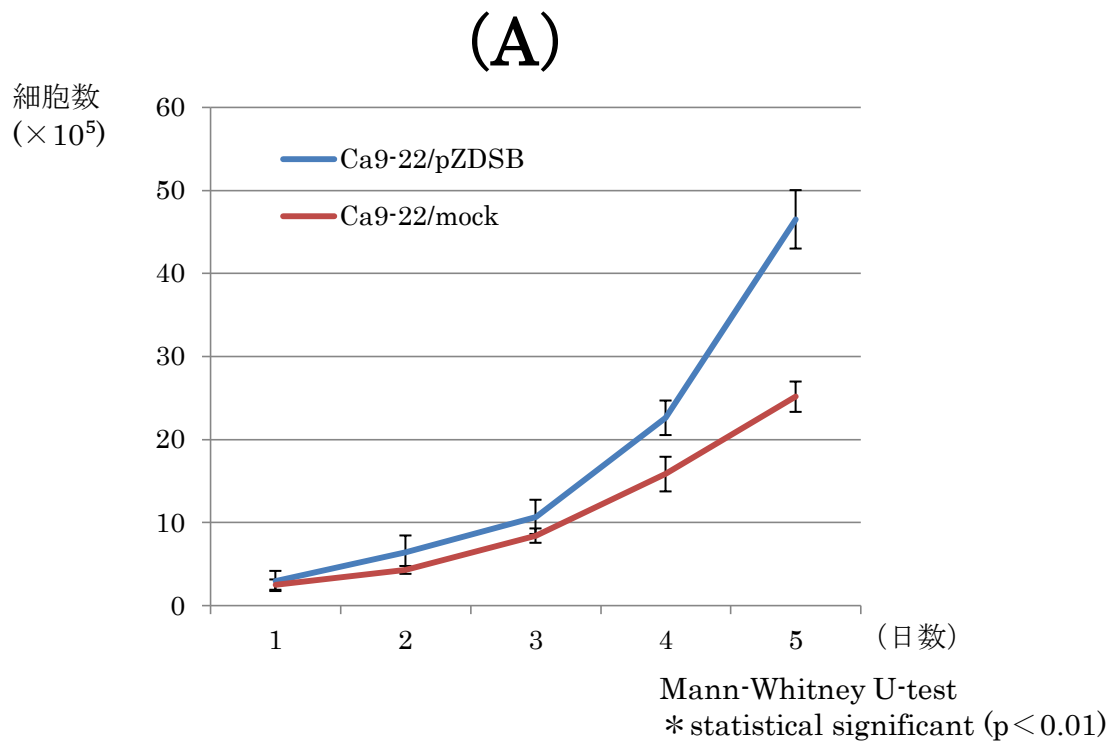


図-5 pZDSB(*ENO1* 遺伝子)導入細胞(Ca9-22/pZDSB)と mock 細胞(Ca9-22/mock)の細胞増殖

(A) は細胞数を数値にて表した。バーは誤差範囲を示す。

(B) は細胞数を対数表記にし、近似直線をとった。