

学位論文

検体由来膠芽腫細胞を用いた膜たんぱく質 PCDH10 の機能解析

Molecular and functional analysis of PCDH10

平成 26 年 1 月 博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

越前 佳奈恵

概要

グリオブラストーマ（膠芽腫）は最も悪性度が高い脳腫瘍である。周辺組織への浸潤性が高く、手術での全摘出は困難であり、診断後の5年生存率は10%以下である。本研究では膠芽腫に対する抗がん剤開発のための新規分子標的の探索を目的として、検体由来膠芽腫細胞株を用いて網羅的 RNAi スクリーニングを行った。この中で見出された7遺伝子のうち、抗体医薬の標的となる可能性のある膜たんぱく質をコードする PCDH10 遺伝子に着目し、膠芽腫細胞株における機能を解析した。本研究では膠芽腫検体より樹立した膠芽腫細胞株を用い、siRNA によって内在性の PCDH10 の発現を抑制して、様々な解析を行った。その結果、PCDH10 の発現抑制によって、膠芽腫細胞株の運動能や浸潤能が抑制されるだけでなく、細胞増殖抑制、アポトーシスの促進が起こり、さらに腫瘍形成能が抑制されることが明らかとなった。膠芽腫検体の腫瘍組織での発現を確認するため、膠芽腫検体組織切片の染色を行った結果、半数以上の検体において腫瘍細胞での PCDH10 の発現が認められた。以上の結果から、PCDH10 は新たな抗体医薬の標的となる可能性があると考えられる。

Two-hybrid 法を用いて結合因子の探索を行った結果、PCDH10 の細胞内結合因子として新たに Cul3 ユビキチンライゲース複合体のアダプターたんぱく質である KLHL20 を同定した。本研究では PCDH10 が KLHL20 複合体によるポリユビキチン化修飾の基質となること、KLHL20 の発現抑制によって PCDH10 の細胞内局在が変化することを明らかにした。また、KLHL20 の発現抑制によって PCDH10 依存的に細胞間結合力が増大することから、KLHL20 が内在性の PCDH10 たんぱく質量を局所的に調節することによって、時空間的に細胞間接着を制御していると考えられた。

Abstract

Glioblastoma is one of the most malignant brain tumors. It is a highly invasive and progressive tumor type, with a median life expectancy of only 12-17 months after diagnosis. In this study, we performed an RNA interference (RNAi) screen to identify molecular targets for the therapy of glioblastoma. We found that knockdown of several genes, including the cadherin-related transmembrane protein PCDH10, suppresses the tumorigenicity of glioblastoma cells. We show here that suppression of the expression of PCDH10 by RNAi induces the growth arrest and apoptosis of glioblastoma cells *in vitro*. Furthermore, we demonstrate that knockdown of PCDH10 inhibits the growth of glioblastoma cells xenografted into immunocompromised mice. These results suggest that PCDH10 is required for the proliferation and tumorigenicity of glioblastoma cells. We speculate that PCDH10 may be a promising target for the therapy of glioblastoma.

To clarify the molecular function of PCDH10, we screened a human testis library by the yeast two-hybrid system, using the cytoplasmic domain of PCDH10 as bait. We found that PCDH10 binds to the BACK and kelch-like domains of KLHL20. We further show that KLHL20 promotes polyubiquitination of PCDH10 and control its subcellular localization. We also found that knockdown of KLHL20 results in an increase in PCDH10-mediated cell-cell adhesion. These results suggest that KLHL20 regulates cell-cell adhesion by modulating the subcellular localization of PCDH10.

目次	頁
第 1 章 序論	6
1-1. グリオブラストーマ	6
1-2. 膠芽腫検体由来細胞の培養	6
1-3. がん幹細胞	6
1-4. 膠芽腫幹細胞	6
1-5. プロトカドヘリン	7
1-6. protocadherin10 (PCDH10)	7
1-7. 様々な癌における PCDH10 プロモーター領域のメチル化	7
1-8. JNK とアポトーシス	8
1-9. 膠芽腫と腫瘍血管	8
1-10. KLHL20	8
1-11. ユビキチン修飾	9
第 2 章 結果	10
2-1. 膠芽腫検体由来無血清培養細胞を用いた RNAi スクリーニング	10
2-1-1. 検体由来膠芽腫細胞の培養	10
2-1-2. 検体由来膠芽腫細胞を用いたスクリーニング	10
2-2. 膠芽腫検体由来細胞における PCDH10 の機能解析	11
2-2-1. PCDH10 は膠芽腫検体由来細胞の無血清培養株で高い発現を示す	11
2-2-2. PCDH10 は膠芽腫検体組織で発現している	11
2-2-3. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の運動能が低下する	11
2-2-4. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の浸潤能が低下する	12
2-2-5. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の増殖が抑制される	12
2-2-6. PCDH10 のノックダウンによってアポトーシスが誘導される	12
2-2-7. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の自己複製能が低下する	12
2-2-8. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の腫瘍形成能が低下する	12
2-2-9. 質量分析による PCDH10 結合タンパク質候補の同定	13
2-2-10. PCDH10 のノックダウンによって JNK が活性化する	13
2-3. 膠芽腫組織での PCDH10 発現細胞の役割	14
2-3-1. PCDH10 は腫瘍血管内皮特異的に発現している	14
2-3-2. PCDH10 ノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の管腔形成が阻害される	14
2-4. PCDH10 の分子レベルでの機能解析	14
2-4-1. 新規 PCDH10 結合因子として KLHL20 を同定した	15
2-4-2. PCDH10 は KLHL20 と結合する	15

2-4-3. 内在性のPCDH10タンパク質は内在性のKLHL20タンパク質と結合する	15
2-4-4. KLHL20はBACKドメイン及びKelchドメインを介してPCDH10と結合する	15
2-4-5. PCDH10はKLHL20-Cul3複合体によるユビキチン化修飾を受ける	16
2-4-6. KLHL20ノックダウンによって、細胞膜上PCDH10の量が増加する	16
2-4-7. KLHL20ノックダウンによって、細胞膜上にPCDH10が濃縮してくる	17
2-4-8. KLHL20ノックダウンによって、細胞膜上に存在するPCDH10タンパク質のエンドサイトーシスが抑制される	17
2-4-9. PCDH10の強制発現によって細胞間接着が亢進する	17
2-4-10. KLHL20のノックダウンによってPCDH10依存的に細胞間接着が亢進する	17
2-4-11. KLHL20及びPCDH10のノックダウンによってE-cadherin、N-cadherinのタンパク質量が変化する	18
2-4-12. KLHL20及びPCDH10のノックダウンによって、E-cadherin、N-cadherinの局在は変化しない	18
2-4-13 内在性のPCDH10とE-cadherinは細胞間結合部位では共局在しない	19
2-4-14. srcファミリーチロシンキナーゼとのコトランスフェクションによってユビキチン修飾が阻害もしくは促進される	19
2-4-15. PCDH10はAblによってin vivo, in vitroでリン酸化修飾を受ける	19
2-4-16. Ablによるリン酸化修飾を受けるチロシン残基の同定	19
2-4-17. Ablによるリン酸化修飾はin vivo ubiquitinationを促進する	19
第3章 考察	20
3-1. 膠芽腫形成におけるPCDH10の役割	21
3-2. 腫瘍血管内皮細胞におけるPCDH10の機能	21
3-3. PCDH10の細胞内での局在と、細胞間接着に関する機能	21
3-4. KLHL20によるE-cadherinの発現量の調節について	22
第4章 結論	23
第5章 表	24
第6章 材料と方法	28
第7章 図	41
第8章 参考文献	78

1. 序論

1-1. グリオブラストーマ

1984年から2000年までの統計によると、グリオーマの患者数は原発性脳腫瘍の中で2番目に多い26.6%を占める。グリオブラストーマ（膠芽腫）はグリオーマのうち34.5%を占め、グリオーマの中では最も発生頻度の高い腫瘍である。標準治療としては、外科的手術による摘出後、アルキル化剤であるテモゾロミドによる化学療法と放射線治療を併用した治療が行われるが、非常に浸潤性の高い腫瘍であるため手術による完全な摘出が困難であり、摘出箇所近辺から短期間に高い確率で再発が起こる。診断後の5年生存率は10%以下と非常に予後の悪い腫瘍である。血管増生や、高い増殖性が特徴の癌で、腫瘍中心部には壊死が認められる。脳血液関門の存在があり、脳組織内深部への薬剤の供給が困難であること、また近年薬剤耐性のあるがん幹細胞の存在が指摘されており、これらの因子が予後を悪くする原因として考えられている[1]。

1-2. 膠芽腫検体由来細胞の培養

2003年にSinghらによって、膠腫検体組織由来の細胞を無血清培地を用いて培養すると、神経幹細胞様のsphereを形成し、継代培養可能であることが報告された[2, 3]。無血清培養で培養した膠芽腫検体由来の細胞は従来使用されている血清培地で培養したグリオーマ細胞株と比較して、より膠芽腫組織サンプルの遺伝子発現パターンに近い状態で継代培養を行うことができ、膠芽腫モデルとして広く用いられている[4]。また、2009年にはPollardらによって、ラミニンコートディッシュを用いて、腫瘍形成能を維持したまま検体由来膠芽腫細胞を接着状態で継代培養を行うことが可能であることが報告された。この方法により、マイグレーションアッセイなどのアッセイが可能になっただけでなく、細胞に接する培地や酸素濃度などを均一な条件で培養することが可能となった[5]。

1-3. がん幹細胞

近年、癌組織は不均一な細胞集団によって構成されておりこの中でも高い腫瘍形成能を持つ細胞はごく一部であることが示唆された。これらは自己複製能や多分化能など幹細胞様の性質を持つことから癌幹細胞と呼ばれている[6]。1997年、急性骨髄性白血病でその存在が報告されて以来、乳癌、大腸癌など様々な癌で癌幹細胞の存在が報告されてきた[2, 3, 7-13]。これら癌幹細胞は、高い薬剤排出能力と、DNA修復能力を持つことから、化学療法や放射線療法など従来の治療に耐性であると考えられている[14, 15]。このためがん幹細胞は抗癌剤開発の新たな標的として位置づけられている。

1-4. 膠芽腫幹細胞

2003年にSinghらの報告によって、無血清培地を用いて培養した膠芽腫細胞の中に神経

幹細胞マーカーとしても用いられる CD133 陽性の細胞集団が存在し、ヌードマウスへの同所移植では CD133 陽性細胞はわずか 100 個の細胞で腫瘍を形成することが可能であり、CD133 陰性の細胞と比較して高い腫瘍形成能を持つということが報告された[2, 3]。これらの細胞を血清添加培地で培養すると、細胞は培養皿に接着し、SOX2、Nestin、CD133 などの神経幹細胞マーカーの発現が低下することや、腫瘍形成能が著しく低下することが報告されており、膠芽腫幹細胞は血清刺激で分化して幹細胞性を失うと考えられている[2-4]。

1-5. プロトカドヘリン

細胞外に5つのカドヘリンドメインを持つ典型的なカドヘリンに比べ、プロトカドヘリンは5つ以上のカドヘリンを細胞外に持つことが報告されている。典型的なカドヘリンは細胞外にあるカドヘリンドメインのうち、3番目と5番目に特徴的な配列を持つが(3番目にはカドヘリンドメインの特徴である DRE 配列の置換が、5番目には4つのシステイン残基を含む)、プロトカドヘリンにはこの特徴が見られない。また、プロトカドヘリンは典型的なカドヘリンに比べて、多様な細胞内ドメインをもち、これらが異なる下流のシグナル伝達因子と結合することで、それぞれ異なる働きをしていると考えられている[16]。

1-6. protocadherin10 (PCDH10)

PCDH10(OL-protocadherin)は δ -2 プロトカドヘリンファミリーに属する1回膜貫通型タンパク質である[17]。細胞外に6つのカドヘリンドメインを持つ。細胞間結合部位に局在し、典型的なカドヘリンよりは弱いですが、細胞間結合を促進する[18]。PCDH10はラメリポディア上に局在し、細胞内ドメインでNap1-WAVEコンプレックスと結合してactin骨格を制御することで、細胞シート上での細胞運動を促進することが報告されている[19]。

神経細胞の軸索投射に重要であり、PCDH10ノックアウトマウスでは線条体ニューロンの軸索投射異常が報告されている[20]。また、この他にPCDH10の神経細胞における働きとしてはユビキチン化されたPSD95と結合して、PSD95の分解を促進することでシナプス消失に重要な役割を果たすことが報告されている[21]。PCDH10は神経細胞における様々な機能に関与するため、PCDH10の欠損は神経細胞の生理活性に重大な支障をきたす。自閉症の患者ではPCDH10遺伝子の欠損が報告されており、自閉症の主な原因遺伝子の一つとして考えられている。[21, 22]

1-7. 様々な癌における PCDH10 プロモーター領域のメチル化

近年、様々な癌種においてPCDH10の発現の低下とグレードや予後の相関が報告されている。PCDH10遺伝子は4q28.3ローカスに存在するが、乳癌、食道癌、大腸癌など多くの癌でこの領域にメチル化が入り、mRNAの発現が低下しているとの報告がある[23-36]。また、膀胱癌ではPCDH10のプロモーター領域のメチル化が入っている患者のほうが、メチル化されていない患者よりも予後が悪いとの報告もある[34]。また大腸癌細胞株や胃癌細胞株では、

PCDH10の強制発現によって細胞増殖が抑制されるとの報告もあり、PCDH10は癌抑制的に働いているとする報告も多い[26, 30]。

1-8. JNKとアポトーシス

JNKはMAPキナーゼファミリーに属し、細胞の増殖や分化に様々な役割を果たす[37]。アポトーシスには主に、TNF α やFAS-Lなどのデスレセプターを介した外部因子によって引き起こされる経路、もしくはUVや低酸素によってミトコンドリア膜透過性遷移孔(MPT)が開くことによって引き起こされる経路の2種類が存在するが、JNKはその両方に関わる[38, 39]。JNKはMKK4やMKK7などのMAP2Kによってリン酸化を受けると、核内に移行して、c-junやp53を初めとする様々な転写因子をリン酸化し、活性化することによって、アポトーシスを促進する[40, 41]。また、これらアポトーシスを引き起こす刺激により、JNKは直接ミトコンドリア内に移行し、ミトコンドリアからのシトクロームcの放出に重要な役割を果たすことが報告されている[42]。

1-9. 膠芽腫と腫瘍血管

膠芽腫は他の癌種と比較して非常に血管に富む癌として知られている。膠芽腫組織内への血管新生についてその原因となる5つの現象が提唱されている。①血管吸収(co-option)。既にある正常血管の周りをがん細胞が取り囲む現象。②血管形成(angiogenesis)。血管吸収をしたがん細胞は低酸素の環境を作り出す。この際、低酸素状態で安定化するHIF1などの因子によってANG2やVEGFの発現が亢進し、血管芽形成を誘導する。③脈管形成(vasculogenesis)。血管内皮前駆細胞として知られる骨髄由来細胞(BMDC)や骨髄由来腫瘍関連マクロファージ(TAM)が腫瘍血管内皮細胞を構成する。これらの細胞はCXCR4を発現し、そのリガンドであるSDF1 α の濃度依存的に遊走する。膠芽腫の腫瘍血管においてSDF1 α の発現の亢進が報告されておりBMDCやTAMのリクルートを促進していると考えられている。④血管擬態(Vascular Mimicry)。癌細胞自身が管腔状の構造を作ることが報告されている。腫瘍血管は正常血管と比較して構造がゆるく、血液が漏れやすいが、これは腫瘍細胞自身が不完全な管腔構造を形成することが原因と考えられている。⑤分化転換(trans differentiation)。検体由来膠腫細胞を血管内皮細胞分化培地を用いてマトリゲル上で培養すると血管内皮細胞様の管腔形成をし、その際CD31、CD34、vWFなどの血管内皮細胞マーカーの発現が上昇することから、癌細胞自身が血管内皮細胞に分化する能力をもつと考えられている[43, 44]。血管新生は腫瘍組織の維持に重要な現象であり、そのメカニズムの解明は、抗がん治療の開発に際して非常に大きなヒントとなりうる。

1-10. KLHL20

KLHL20はkelch like proteinファミリーに属する遺伝子である[45]。保存された3つの

ドメインをもち、N 末端から E3 ユビキチンライゲースである Cullin3 (Cul3) と結合する BTB ドメイン[46]、機能未知の BACK ドメイン[47]、c 末端に 6 つの kelch domain からなる kelch like repeat が存在する。KLHL20 は kelch-like repeat ドメインを介して Cul3 ユビキチンライゲースの基質と結合し、ユビキチン修飾反応の足場タンパク質としての働くことが報告されている。KLHL20 遺伝子のプロモーター上には低酸素応答配列 (HRE) が存在し、その発現が低酸素によって亢進することが報告されている [48]。主な基質としては、DAPK、PML、PDZ-RhoGEF などが報告されており、これらの基質をユビキチン化して分解することにより、アポトーシスの抑制や、軸索突起成長の促進を引き起こすことが報告されている [48-50]。また、mature な細胞接着が形成される前の初期接着部位に存在すること、一過的に E-cadherin と共局在することが報告されており、細胞間接着サイトの形成に重要な役割を果たすと考えられている [45]。KLHL20 のノックアウトマウスは角膜形成に異常が見られるが、これは KLHL20 を介した細胞接着サイト形成が阻害された結果、上皮細胞層の形成に異常が生じたことが原因と考えられている [51]。

1-11. ユビキチン修飾

ユビキチンは 76 個のアミノ酸からなるタンパク質である。ユビキチン修飾は基質のリジン残基を介しておこなうが、ユビキチンの 63 番目のリジン残基を介してつながったポリユビキチン修飾は様々なタンパク質のプロテアソームによる分解を促進することが知られている [52, 53]。また、ユビキチン修飾はこれ以外にも小胞輸送やヒストン修飾に関わるシグナルとして働くことも報告されている [54, 55]。膜タンパク質に対するユビキチン修飾の多くは、エンドサイトーシスを促進することが報告されており、モノユビキチン修飾、マルチユビキチン修飾 (モノユビキチン修飾が基質の複数のサイトに入る)、ユビキチンの 48 番目のリジン残基を介したポリユビキチン修飾など、一口にユビキチン修飾といっても様々な形でユビキチンが付加される。例えば、EGFR は、基質である EGF 依存的にユビキチンライゲースである Cbl と結合すること [56]、E-cadherin はチロシンキナーゼである Src の活性依存的にユビキチンライゲースである Hakai と結合すること [57]、両タンパク質共にユビキチン修飾が行われた後、エンドサイトーシスが促進されることが報告されている。この様に、膜タンパク質に対するユビキチン修飾は刺激依存的に、一過的、部分的に行われることが多く報告されており、動的なタンパク質量制御を担っていると考えられている。ユビキチン修飾の研究は細胞内で引き起こされる動的な現象をひも解く鍵となりうる可能性を秘めている [58]。

2. 結果

2-1. 膠芽腫検体由来無血清培養細胞を用いた RNAi スクリーニング

膠芽腫幹細胞を標的とした抗がん剤の新規標的因子を探索するため、siRNA および shRNA ライブラリーを用いて、各スクリーニング対象遺伝子の発現を抑制し、膠芽腫幹細胞マーカーである CD133 mRNA の発現量が変化する遺伝子を探索した。

2-1-1. 検体由来膠芽腫細胞の培養

既知の報告通り [4, 5]、膠芽腫検体由来細胞 GB2 は無血清培地培養下で (GB2-S) 神経幹細胞様のスフィアを形成した (図 1A)。これらの細胞を血清添加培地をもちいて培養すると培養皿に接着した (GB2-D)。また、GB2-S 細胞は、GB2-D 細胞と比較して、CD133 mRNA の発現量が極めて多かった (図 1B)。さらに、GB2-S 細胞をヌードマウス頭蓋内に同所移植して経過を観察した結果、GB2-S 細胞を移植したマウスの 4 ヶ月生存率は、GB2-D 細胞を移植したマウスの 4 ヶ月生存率よりも著しく低かった。この結果から、既に報告されている通り ([2, 3])、GB2-S 細胞は GB2-D 細胞と比較して極めて高い腫瘍形成能を持つと考えられた (図 1C)。

2-1-2. 検体由来膠芽腫細胞を用いたスクリーニング

膠芽腫検体由来細胞株 GB2、GB3 を無血清、血清添加それぞれの条件で 1 ヶ月以上培養し、U133plus2.0 のチップを用いてマイクロアレイ解析を行って、両培養条件下で発現変動する遺伝子を抽出した。この中で無血清培養時に高い発現を示した遺伝子のリストを表 1 に示す。また、マイクロアレイ解析の結果、癌幹細胞マーカーである CD133 のプローブである 210409_at と相関係数の高い発現パターンを示す遺伝子を特定し、これらをスクリーニング対象遺伝子とした。加えて、癌幹細胞は正常幹細胞とよく似た表現型を示すことが知られていることから [3]、正常神経幹細胞や ES 細胞において「幹細胞性」の維持に必須とされている因子 (Notch シグナル関連遺伝子、Klf4、Oct3/4、Nanog、Sox2、ポリコム関連遺伝子を始めとするエピジェネティクス制御因子) も、スクリーニング対象遺伝子とした [59-64]。

shRNA (89 遺伝子、142 配列) と siRNA (246 遺伝子、592 配列) を用いてスクリーニングを行い、コントロール細胞と比較した際の CD133 mRNA の相対的な発現量を 0.5 以下に減少させる 52 遺伝子と 2.0 以上に増加させる 11 遺伝子を CD133 mRNA の発現に関わる可能性があると判定した (図 2B、C)。この中には、既に癌幹細胞での腫瘍形成能に関わることを示唆されている Notch シグナルの関連因子なども含まれており [64, 65]、スクリーニング結果の信頼性を確かめることができた。

2-2. 膠芽腫検体由来細胞における PCDH10 の機能解析

抗体医薬開発に向けた新規標的因子を探索するため、無血清培養細胞で高い発現を示す遺伝子の中でも特に膜タンパク質に着目して研究を行った。その中でも、カドヘリンファミリーに属する因子は、がん細胞の運動や増殖に関わることが報告されており、抗がん剤の分子標的となりうる可能性も示唆されていることから [66]、本研究ではプロトカドヘリンファミリーに属する PCDH10 に着目し、機能解析を行った。

2-2-1. PCDH10 は膠芽腫検体由来細胞の無血清培養株で高い発現を示す

前述のマイクロアレイの結果、PCDH10 は無血清培養の細胞株において高い mRNA の発現量を示す遺伝子として同定された (表 1)。GB2-S 細胞、GB-2D 細胞を用いてリアルタイム解析を行い、マイクロアレイの結果を再検証した (図 3) PCDH10 のタンパク質レベルでの発現を確認するため、従来使用される血清培養の膠芽腫細胞株 LN229, T98G, U251 と当研究室で樹立した膠芽腫検体由来細胞株 (GB1-16) からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットにて発現を確認した。その結果、血清添加培地で培養した細胞と比較して、無血清培地で培養した細胞は非常に高いタンパク質発現量を示すことが判明した (図 4)。

2-2-2. PCDH10 は膠芽腫検体組織で発現している

PCDH10 の膠芽腫検体組織での発現を確認するため、PCDH10 抗体を用いて免疫染色を行った。抗体の抗原特性を検証するため、PCDH10 を強制発現した 293FT 細胞のセルブロックのパラフィン切片を作製して、PCDH10 強制発現細胞で強い染色が得られることを確認した (図 5A)。19 例の膠芽腫検体の組織を用いてパラフィン切片を作製し免疫染色を行った結果、11 例 (57%) で PCDH10 陽性の腫瘍細胞が認められた (図 5B、表 2)。正常組織の染色では、既知の報告通りニューロンで高い発現を示した (図 5C) [20]。

2-2-3. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の運動能が低下する

PCDH10 は Nap1/WAVE 複合体と結合しラメリポディア上でのアクチン骨格の制御に関わり、細胞シート上での細胞運動を制御するという報告がある [19]。膠芽腫細胞の細胞運動への寄与を調べるため、GB2 細胞を用いてシングルセルマイグレーションアッセイを行った。GB2 細胞を shRNA 発現ウイルスに感染させ、GFP の蛍光を用いてライブセルイメージングを行った。5 分間隔で 4 時間撮影を行い、各細胞の軌跡を IMARIS によって解析した結果 (図 6A)、PCDH10 ノックダウンによって、コントロールである luciferase や DsRed に対する shRNA 発現ウイルスを感染させた細胞と比較して、GB2 細胞の運動能が 1 細胞レベルで抑制されていることが分かった (図 6B)。シングルセルマイグレーションには、ラミニンコートディッシュを用いたが、基質への接着性の変化がマイグレーションに影響を与えた可能性を検証するため、ラミニンへの接着性の評価を行う実験を行った。GB2 細胞をまき直してから 1 時間後に培養皿に接着している細胞数を測定したところ、PCDH10 のノックダウンによって、

ラミニンへの接着性は変化しなかった (図 6C)。このことから、PCDH10 のノックダウンによる細胞運動性の低下は基質への接着性以外の原因によると考えられる。

2-2-4. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の浸潤能が低下する

膠芽腫は非常に浸潤性の高い腫瘍であるが[67]、PCDH10 の膠芽腫細胞の浸潤能への寄与を調べるため、マトリゲルコーティングをされたボイデンチャンバーを用いて、インベージョンアッセイを行った。上層に無血清培地中に懸濁した GB2 細胞をまき、下層には 10%血清添加培地を用いて 24 時間、下層に向けて細胞を浸潤させた。この結果、PCDH10 をノックダウンした膠芽腫細胞では、浸潤能が有意に抑制されていることが明らかとなった (図 7A、B)。

2-2-5. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の増殖が抑制される

膠芽腫細胞の増殖への PCDH10 の寄与を調べるため、PCDH10 を高発現している膠芽腫検体由来細胞株 GB2、GB3、GB16 細胞を用いてノックダウン実験を行った。PCDH10 をノックダウンすると、これらの細胞の増殖が有意に抑制された (図 8A、B)。一方で、PCDH10 のタンパク質発現量の低い膠腫細胞株 U251、T98G に PCDH10 を強制発現しても、細胞増殖に対する影響は無かった (図 8C、D)。この結果から、PCDH10 が積極的に細胞増殖を促進するのではなく、PCDH10 を高発現する検体由来膠芽腫細胞株において細胞増殖が PCDH10 に依存するようになっていると考えられる。

2-2-6. PCDH10 のノックダウンによってアポトーシスが誘導される

PCDH10 のノックダウンによる細胞増殖抑制がアポトーシスによるものであることを検証するため、アネキシン V アッセイを行った。アポトーシスを起こした細胞はアネキシン V 色素で染色を行った際に陽性となる。GB2 細胞において PCDH10 をノックダウンすると、アネキシン V 陽性画分の細胞が増えたことから、アポトーシスが誘導されていることが明らかとなった (図 9A-C)。

2-2-7. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の自己複製能が低下する

高い腫瘍形成能を持つ細胞は自己複製能を持つため、スフィアを形成することが報告されている [2, 3]。PCDH10 の膠芽腫細胞の自己複製能への寄与を調べるため、GB2 細胞を用いてスフィアフォーメーションアッセイを行った。細胞希釈濃度によらず、一定の割合の細胞がスフィアを作ることから、GB2 細胞の一部の細胞は高い自己複製能を持つことが分かった。また、PCDH10 をノックダウンすることによって、形成されるスフィア数が減少したことから、自己複製能が有意に抑制されていることが分かった (図 10A、B)。

2-2-8. PCDH10 のノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の腫瘍形成能が低下する

PCDH10 の腫瘍形成能への寄与を調べるため、GB16 細胞を用いて、ヌードマウスへの頭蓋内同所移植実験を行った。PCDH10 をノックダウンした細胞を移植した細胞を移植したマウスでは移植後の生存日数が長く、有意な延命が見られた (図 11)。マウス頭蓋内に移植した細胞は浸潤性の高い腫瘍を形成した (図 12)。死亡後のマウスの脳を取り出し、細胞増殖マーカーである Ki67 を用いて免疫染色をおこなった結果、PCDH10 ノックダウン細胞を移植したマウスに形成された腫瘍組織内では Ki67 陽性細胞の割合が著しく低下していた (図 13)。このことから、マウスの脳内においても、PCDH10 ノックダウンによって細胞増殖が低下することが明らかとなった。

2-2-9. 質量分析による PCDH10 結合タンパク質候補の同定

PCDH10 の機能は未知な部分が多く、細胞増殖に関わる相互作用因子は報告されていない。そこで、質量分析を用いて新たな相互作用因子の同定を試みた。293T 細胞に Flag タグ標識した PCDH10 を強制発現し、抗 Flag タグ抗体 (M2) を用いて免疫沈降を行い、control mouse IgG を用いて免疫沈降を行ったサンプルと比較して有意に多く沈降してきたタンパク質のバンドを切り出して質量分析を行った (図 14)。control mouse IgG を用いて免疫沈降を行ったサンプルのうち、切り出したバンドと同分子量付近を切り出してコントロールとして用いた。抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行ったサンプルから検出されたペプチドから、コントロールサンプルより検出されたペプチドを除き、PCDH10 結合タンパク質の候補とした。抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行ったサンプル特異的に検出されたペプチドを含む PCDH10 タンパク質のリストを表 3 に示す。

2-2-10. PCDH10 のノックダウンによって JNK が活性化する

前述の質量分析による解析で、PCDH10 の結合タンパク質候補として JNK を基質とするキナーゼである MEK7 が得られたため、その下流である JNK シグナルについて PCDH10 ノックダウンによる変化を調べた。JNK のリン酸化抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、GB2 細胞で PCDH10 をノックダウンすると、JNK のリン酸化バンドが増えたことから PCDH10 ノックダウンにより JNK シグナルが亢進していることが分かった (図 15A)。次に、この JNK の活性化を阻害するため、JNK の阻害剤である SP600125 を用いた実験を行った。まず、SP600125 の効果を確認するため、JNK を活性化する薬剤である anisomycin との併用実験を行った [68]。GB2 細胞に anisomycin を 10 μ M の濃度で 7 時間添加したところ、JNK 及び c-jun のリン酸化が亢進した。さらに SP600125 を 10 μ M で添加するとこのリン酸化が抑制された (図 15B)。PCDH10 ノックダウン時における JNK シグナル阻害の効果を確認するため、SP600125 を各濃度で添加したところ、PCDH10 ノックダウンによる細胞増殖抑制が SP600125 の濃度依存的にレスキューされた (図 16A、B)。このことから、PCDH10 の下流に JNK シグナルが存在し、細胞増殖を制御していることが考えられた (図 16C)。

2-3. 膠芽腫組織での PCDH10 発現細胞の役割

PCDH10 発現細胞が膠芽腫組織中のどの部分に存在するか確認し、その機能を推察するために、膠芽腫組織を用いた実験を行った。

2-3-1. PCDH10 は腫瘍血管内皮特異的に発現している

膠芽腫検体組織切片を用いた免疫染色の結果、PCDH10 は複数の検体において腫瘍血管内皮で高い発現量を示した。同一検体由来の組織で比較した際、正常血管内皮では PCDH10 の発現は認められなかった (図 17A)。また他の 2 例においても PCDH10 は腫瘍血管内皮で高い発現量を示した (図 17B)。これらの症例は腫瘍細胞自体の PCDH10 発現が陰性であり、PCDH10 は腫瘍組織に存在する細胞の中でも腫瘍血管内皮細胞特異的に発現・機能している可能性が示された。

2-3-2. PCDH10 ノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞の管腔形成が阻害される

血管内皮細胞はマトリゲル上で管腔を形成することが知られている [69]。脳血管内皮細胞由来の培養細胞株である BMVEC を用いても同様の結果が得られた (図 18A)。膠芽腫細胞自身が管腔を形成し血管内皮に分化することは既に報告されているが [44]、当研究室で樹立した細胞株でも同様の結果が得られるか検証した。GB2 をマトリゲル上にまくと、一晩で血管内皮細胞様の管腔を形成した。一方で、PCDH10 をノックダウンすると、この管腔形成が顕著に阻害された (図 18B)。

2-3-3. PCDH10 ノックダウンによって GB2 の BMVEC 細胞シートの形態変化誘引能力が低下する

膠芽腫細胞が脳内の正常血管内皮細胞と相互作用して形態形成に影響を与えるかどうかを明らかにするため、GB2 細胞と脳血管内皮細胞株である hCMEC との共培養を行った (図 19A)。一層にコンフルエントで培養した脳血管内皮細胞 hCMEC 細胞上に GB2 細胞をまくと、一晩で hCMEC の密度に濃淡が現れた。このことから、GB2 細胞が hCMEC 細胞に働きかけ、形態の変化を誘引していると考えられた (図 19B)。ImageJ を用いて細胞が存在しない領域の定量を行った結果、PCDH10 をノックダウンすることによって、共培養により hCMEC 細胞の細胞層に現れる「細胞が存在しない領域」の面積が減少したことから、PCDH10 をノックダウンした細胞は、血管内皮細胞シートの形態変化誘導能が低いことが明らかとなった (図 16B、C)。

2-4. PCDH10 の分子レベルでの機能解析

PCDH10 はアクチン Nap1/Wave 複合体との結合が報告されている他には、相互作用因子に関する報告が無く、分子自体の機能が未知のタンパク質である。そこで、PCDH10 自身の新たな機能を解明するための詳細な解析を行った。

2-4-1. 新規 PCDH10 結合因子として KLHL20 を同定した

PCDH10 の相互作用因子を同定するため、酵母 two-hybrid 法を用いて結合タンパク質の探索を行った。細胞内相互作用因子を同定するため、PCDH10 の細胞内ドメインをベイトとして用いた。Human testis より作製されたライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果を表 4 に示した。この中で血管新生に関わり、PCDH10 のタンパク質制御に関わる可能性のある因子として KLHL20 に着目して、以下詳細な解析を行った。

2-4-2. PCDH10 は KLHL20 と結合する

Two-hybrid スクリーニングの結果を検証するため、in vitro 及び in vivo での結合実験を行った。PCDH10 細胞内ドメインと GST の融合タンパク質を精製し、in vitro translation 法で合成した ³⁵S 標識 KLHL20 の全長を用いて GST プルダウン実験を行った。精製した GST 融合タンパク質は SDS 電気泳動後、CBB 染色を行って収量を確認し、2 μ g をプルダウン実験に用いた (図 20A)。この結果、PCDH10 の細胞内ドメイン (a. a. 738-1040) と KLHL20 の全長は in vitro で結合することが分かった (図 20B)。

PCDH10 と KLHL20 の in vivo での結合を検証するため、PCDH10、KLHL20 それぞれの全長の強制発現用コンストラクトを作製し、タグ認識抗体を用いた免疫沈降実験を行った。PCDH10 には C 末端に Flag タグを、KLHL20 には N 末端に HA タグを付加した。293T 細胞に各タグ標識タンパク質を強制発現して、24 時間後に細胞を回収し、FLAG タグに対する M2 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。PCDH10 と KLHL20 を共発現させた場合のみ免疫沈降バンドが認められたことから、PCDH10 と KLHL20 は in vivo でも結合することが分かった (図 20C)。

2-4-3. 内在性の PCDH10 タンパク質は内在性の KLHL20 タンパク質と結合する

内在性の PCDH10 と KLHL20 の結合を確認するため、PCDH10 細胞外ドメインを認識する Rat モノクローナル抗体を作製し、免疫沈降実験を行った。293FT 細胞セルライゼートを用いて一晚免疫沈降を行った結果、PCDH10 に対するモノクローナル抗体 PCDH10#002 添加時特異的に内在性の KLHL20 のバンドが確認できた (図 21)。このことから、PCDH10 と KLHL20 は内在性レベルの発現でも結合することが分かった。

2-4-4. KLHL20 は BACK ドメイン及び Kelch ドメインを介して PCDH10 と結合する

KLHL20 は N 末端から、Cul3 ユビキチンライゲースコンプレックスと結合する BTB ドメイン、機能未知の BACK ドメイン、ユビキチン付加の基質と結合する kelch-like repeat の 3 つのドメインから構成される [46, 47]。Two-hybrid スクリーニングで PCDH10 の細胞内ドメインと結合するとして同定されたクローンは、3 クローンとも BACK ドメインを含む領域をコードしていた (図 22A)。PCDH10 と結合するドメインを同定するため KLHL20 の各ドメインを欠損させた変異体を作製して in vivo 結合実験を行った (図 22B)。その結果、BTB ドメイ

ンのみの変異体と比較して、BACK 及び kelch ドメインを含む変異体は PCDH10 との高い結合力を示した。以上の結果より KLHL20 は BACK ドメイン、kelch-like repeat を介して PCDH10 と結合することが分かった。

2-4-5. PCDH10 は KLHL20-Cul3 複合体によるユビキチン化修飾を受ける

Cullin3 (Cul3) は ROC1 と複合体を作り、BTB ドメインを持つタンパク質と結合することにより様々なタンパク質のユビキチン修飾を引き起こす[46, 70]。KLHL20 はユビキチンライゲースコンプレックスである Cul3 複合体のアダプタータンパク質として働き、ユビキチンライゲースの基質と複合体を結合する役割を果たすことが報告されている[48-50]。そこで、PCDH10 が KLHL20-Cul3 複合体の基質となる可能性を検証するため、*in vivo* ubiquitination assay を行った。

293FT 細胞にタグを付加した各タンパク質を発現させた後、抗 myc タグ抗体を用いて myc 標識した PCDH10 を免疫沈降し、ポリユビキチン修飾を受けた PCDH10 のバンドの濃淡からユビキチン修飾量を調べた。その結果、PCDH10 はポリユビキチン修飾されるが(図 23、左から 2, 3 番目の lane)、KLHL20 と共発現することによりユビキチン修飾が亢進することが明らかとなった(図 23、左から 3, 4 番目の lane)。このポリユビキチン化修飾が Cul3 複合体依存的であることを確認するため、Cul3 複合体との結合に必要な 6 つのアミノ酸残基を置換した変異体 KLHL20m6 変異体を用いて実験を行った結果[49]、PCDH10 と KLHL20m6 変異体の結合量は、PCDH10 と野生型の KLHL20 との結合量と比較して変化しないが(図 23、上から 3 段目)PCDH10 のポリユビキチン化は著しく阻害された(図 23、左から 4, 5 番目の lane)。また、PCDH10 と結合しない BTB ドメインの強制発現によっても PCDH10 のポリユビキチン化が阻害された(図 23、左から 4, 6 番目の lane)。以上の結果から、*in vivo*において、KLHL20 複合体が PCDH10 のポリユビキチン化修飾を引き起こすことが可能であることが明らかとなった。

2-4-6. KLHL20 ノックダウンによって、細胞膜上 PCDH10 の量が増加する

膜タンパク質である E-cadherin は、ユビキチン修飾によってエンドサイトーシスが促進されることが報告されている[57]。同様に、KLHL20 による修飾が PCDH10 の膜局在への変化を制御する可能性を検証するため、KLHL20 のノックダウンによって、PCDH10 の細胞内での局在が変化するかを検討した。293FT 細胞に siRNA をトランスフェクションし、96 時間後に細胞膜上に発現しているタンパク質をビオチン化修飾してから溶解し、アビジンビーズを用いてプルダウンアッセイを行った。細胞膜上に存在するタンパク質のコントロールとして β 4-integrin を、細胞質に存在するタンパク質のコントロールとして α -tubulin を用いて、この条件によって細胞膜に存在するタンパク質が濃縮されてくること、細胞質のタンパク質がプルダウンされてこないことを確認した(図 24)。KLHL20 ノックダウンによって、プルダウンされてくる PCDH10 の量が増加したことから、KLHL20 ノックダウンにより、細胞膜

表面上に存在する PCDH10 の量が増加することが分かった (図 24)。

2-4-7. KLHL20 ノックダウンによって、細胞膜上に PCDH10 が濃縮してくる

KLHL20 ノックダウンによる PCDH10 の局在変化をさらに検証するため、抗 PCDH10 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。293FT 細胞において、KLHL20 に対する siRNA2 配列を用いてノックダウンを行い、96 時間後に固定して染色を行った。この結果、KLHL20 ノックダウンによって細胞の底面部分 (basal) ではフリーエッジの部分に、細胞の長端側 (apical) 側ではフリーエッジ及び細胞間に PCDH10 が濃縮してくることが分かった (図 25)。

2-4-8. KLHL20 ノックダウンによって、細胞膜上に存在する PCDH10 タンパク質のエンドサイトーシスが抑制される

KLHL20 ノックダウンによる細胞膜上の PCDH10 のタンパク質変化がエンドサイトーシスの変化によるものである可能性を検証するため、293FT 細胞で KLHL20 をノックダウンしてエンドサイトーシスアッセイを行った。細胞膜表面に存在するタンパク質をビオチン標識し、4 時間 37°C で培養を行った後、グルタチオン溶液を用いて細胞膜表面に存在するタンパク質のビオチン修飾を剥がした。細胞を溶解した後、アビジンビーズを行ってプルダウンアッセイを行い、4 時間の間にエンドサイトーシスによって細胞質内に取り込まれたビオチン標識タンパク質を定量した。この結果、細胞膜上に存在する PCDH10 タンパク質のうち、エンドサイトーシスによって細胞質内に取り込まれたビオチン化標識 PCDH10 のタンパク質の量は、KLHL20 ノックダウンによって、減少することが明らかになった (図 26A、B)。

2-4-9. PCDH10 の強制発現によって細胞間接着が亢進する

PCDH10 は細胞間接着部位に局在し、細胞のアグリゲーションを促進することが報告されている [18]。PCDH10 の細胞間接着への寄与を再検証するため、293FT 細胞に PCDH10 を強制発現し、クランプアッセイを行った。PCDH10 強制発現によって、ピペッティング後の細胞塊に含まれる細胞数 (Nc/Np 値) が増えたことから、PCDH10 によって、細胞間接着が亢進することが再確認された (図 27A、B)。この際、全長の PCDH10 が強制発現されていることをウエスタンブロット解析を行い確認した (図 27C)。

2-4-10. KLHL20 のノックダウンによって PCDH10 依存的に細胞間接着が亢進する

KLHL20 及び PCDH10 複合体の細胞接着への寄与を検証するため、siRNA を用いて 293FT 細胞の内在性タンパク質の発現を抑制してクランプアッセイを行った。siRNA を用いて KLHL20 の発現を抑制すると、1 層で培養していた細胞が培養皿上で凝集した形態をとった。さらに、PCDH10 とのダブルノックダウンによって、この表現形がレスキューされた (図 28A)。クランプアッセイを行った結果、KLHL20 のノックダウンによって Nc/Np 値が著しく増加したことから、細胞間接着力が増大したことが考えられた。また、KLHL20 と PCDH10 に対する siRNA

のコトランスフェクションによって KLHL20 ノックダウンによる接着力の増大がレスキューされた (図 28B)。この結果から、KLHL20 のノックダウンによる細胞接着の亢進には PCDH10 が介在することが示唆された。また、siRNA をトランスフェクションして 96 時間後の細胞を固定し抗 PCDH10 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、前述の結果と同様に、KLHL20 ノックダウンによって細胞膜上のシグナルが増大した。このシグナルは PCDH10 ノックダウンによって減弱したことから、内在性の PCDH10 の局在を正確に検出できていることが確認できた (図 29)。また、細胞頂端部での細胞間の染色の強度と、クランプアッセイの結果が一致することからも、KLHL20 のノックダウンによる細胞接着の亢進には PCDH10 が介在すると考えられた。

2-4-11. KLHL20 及び PCDH10 のノックダウンによって E-cadherin、N-cadherin のタンパク質量が変化する

E-cadherin や N-cadherin などのクラシカルなカドヘリンは、プロトカドヘリンと比較して、強い細胞間結合力を持つことが報告されている [18]。細胞間接着力の変化が PCDH10 以外の典型的なカドヘリンタンパク質量の増大である可能性を検証するため、代表的なカドヘリンである E-cadherin 及び N-cadherin のタンパク質量を定量した。KLHL20 及び PCDH10 をノックダウンした 293FT の細胞のライセートを用いてウエスタンブロットを行った結果、PCDH10 ノックダウンによって E-cadherin 及び、N-cadherin のタンパク質量が減少した。また、E-cadherin は KLHL20 単独のノックダウンによってもタンパク質量が減少した (図 30)。さらに KLHL20 に対する siRNA をもう 1 配列用いて確認したところ、やはり、KLHL20 ノックダウンによって、E-cadherin のタンパク質量は減少した (図 31)。異なる細胞数でノックダウン実験を行っても同様の結果が得られたことから、E-cadherin のタンパク質量の減少は、フリーエッジ、細胞間接着部位の数の差によるものではなく、KLHL20 のノックダウンによる影響と考えられる。

2-4-12. KLHL20 及び PCDH10 のノックダウンによって、E-cadherin、N-cadherin の局在は変化しない

KLHL20 単独ノックダウンで細胞間接着力が増加することから、Eカドヘリン及び、Nカドヘリンの細胞間での局在が変化している可能性を検証した。293FT 細胞において KLHL20 及び PCDH10 をノックダウンした後、Eカドヘリン及び Nカドヘリン抗体を用いて免疫染色を行った (図 32)。その結果、各タンパク質の染色強度は前述のウエスタンブロットの結果を反映して、増減したが、E-cadherin 及び N-cadherin の局在は変化しなかった。

2-4-13 内在性の PCDH10 と E-cadherin は細胞間結合部位では共局在しない

PCDH10 と E-cadherin の共局在を調べるため、293FT 細胞において共染色を行った。細胞底面部分 (basal) に存在する細胞間結合部位には主に E-cadherin が存在するが、頂端部分

(apical) では、PCDH10 が細胞間結合部位に存在する割合が増えた (図 33)。この結果から、細胞間結合部位では PCDH10 と E-cadherin は共局在しないこと、細胞底面の成熟した細胞間結合部位には PCDH10 は存在しないことが分かった。

2-4-14. src ファミリーチロシンキナーゼとのコトランスフェクションによってユビキチン修飾が阻害もしくは促進される

KLHL20 によるポリユビキチン化修飾を促進もしくは抑制するシグナルを探索するため、当研究室で所有する様々な活性化型チロシンキナーゼ強制発現用コンストラクトとの共発現実験を行った。Src によるリン酸化修飾が E カドヘリンのポリユビキチン化を促進するという報告が有ることから [57]、Src ファミリーのキナーゼ (Src、Lyn、Yes、Hck、Fyn) と、c-ABL を用いて実験を行った。その結果、活性化型 src との共発現により PCDH10 ポリユビキチン化修飾が抑制され、c-ABL との共発現によりポリユビキチン化修飾が亢進することが分かった (図 34、35)。

2-4-15. PCDH10 は Abl によって in vivo, in vitro でリン酸化修飾を受ける

ポリユビキチン化修飾を促進するシグナルに着目するため、c-ABL について詳しい解析を行った。PCDH10 が c-ABL によってリン酸化修飾を受ける基質となる可能性を検証するため、in vivo 及び in vitro リン酸化アッセイを行った。293FT 細胞に c-ABL 及び PCDH10-myc を共発現させ、myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗チロシンリン酸化抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、c-ABL を発現した細胞でのみ PCDH10 のリン酸化が確認できた (図 36A)。in vitro リン酸化アッセイの結果、c-Abl リコンビナントの量依存的に、PCDH10 のチロシンリン酸化が増加した (図 36B)。以上の結果から、PCDH10 は c-Abl によるリン酸化修飾の基質となり得ると考えられる。

2-4-16. Abl によるリン酸化修飾を受けるチロシン残基の同定

Abl によってリン酸化修飾を受けるチロシン残基を同定するため、PCDH10 の細胞内ドメインに存在するチロシン残基をフェニルアラニンに変えた変異体を作製し、in vivo リン酸化アッセイを行った。Y749, Y821, Y1029, Y1033 に対する変異体を用いた際に PCDH10 のリン酸化バンドのシグナルが減少したことから、これらのチロシン残基は c-Abl の下流でリン酸化修飾を受ける可能性があることが分かった (図 37A、B)。

2-4-17. Abl によるリン酸化修飾は in vivo ubiquitination を促進する

チロシン残基へのリン酸化修飾がユビキチン化反応に与える影響を調べるため、前述の変異体のうち、Y821F 変異体を用いて in vivo ubiquitination assay を行った。野生型の PCDH10 は c-Abl との共発現によってポリユビキチン修飾が亢進する一方で、Y821 変異体では c-Abl との共発現によって、ポリユビキチン修飾が WT ほど促進されなかった (図 38)。

このことから、c-Abl を介した Y821 へのリン酸化修飾は、PCDH10 のポリユビキチン化に重要であることが分かった。

3. 考察

3-1. 膠芽腫形成における PCDH10 の役割

膠芽腫細胞を用いた *in vitro* の実験では、PCDH10 ノックダウンによって、運動・浸潤能の抑制、細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導などが起こり、PCDH10 が腫瘍の示す様々なフェノタイプに重要な役割を果たしていることが示唆された。PCDH10 ノックダウン細胞を移植したマウス脳内の腫瘍を Ki67 染色することにより腫瘍内での増殖細胞数を測定した結果、マウス脳内での腫瘍細胞の増殖は、*in vitro* で得られた結果と一致して、著しく抑制されていた。このことから、PCDH10 ノックダウンによる腫瘍形成能の抑制には、PCDH10 の増殖に対する機能が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、腫瘍細胞のマウス脳内での浸潤能には変化は見られなかった。

PCDH10 の下流シグナルを探索する実験において、PCDH10 ノックダウンによって、JNK シグナルを介した細胞増殖抑制が引き起こされることを明らかにした。しかし、膠芽腫細胞において PCDH10 をノックダウンした際、アポトーシスが引き起こされるのは、細胞をノックダウンしてから 1 週間後、しかも、細胞を薄めにまきなおさないとこのフェノタイプが現れないことから、PCDH10 の発現を抑制したことによって積極的に JNK が活性化したのではなく、細胞密度の低下や、栄養の枯渇など、細胞がストレスにさらされた際に細胞増殖抑制や、アポトーシスが引き起こされ易くなっていたのではないかと考えられる。JNK がストレス応答性の因子であるということからも、このことが推察される [71]。このことから、PCDH10 は膠芽腫細胞において、周囲の環境からのストレスに対する頑健性を保つのに重要な役割を果たしているのではないかと推察される。

3-2. 腫瘍血管内皮細胞における PCDH10 の機能

本研究では、PCDH10 が腫瘍血管内皮特異的に発現していることを明らかにした。腫瘍血管内皮細胞の形成には、様々な要因があるが、本研究では、膠芽腫細胞自体が血管状の構造を形成する際に PCDH10 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。このことから、PCDH10 が膠芽腫細胞において、細胞間接着に関わる機能を有していることが推察される。今後、症例数を増やして検証を行っていく必要がある。

3-3. PCDH10 の細胞内での局在と、細胞間接着に関する機能

本研究では、KLHL20 依存的に、PCDH10 の細胞内での局在が変化することを明らかにした。ユビキチン化修飾と局在の変化の直接的な関係については明確に示唆するデータが得られていないが、KLHL20 によって PCDH10 のポリユビキチン化修飾が促進されることから、おそらく、KLHL20 による PCDH10 に対する修飾が局在変化を引き起こすのではないかと推察される。KLHL20 ノックダウンによって、細胞の頂端部分の細胞間結合部分に PCDH10 が濃縮してくること、この際、E-cadherin のタンパク質量が低下することから、KLHL20 ノックダウン

による細胞間接着力の増大には、PCDH10 の局在変化が大きく寄与しているのではないかと考えられる。E-cadherin と PCDH10 は細胞間結合部位において基本的に共局在しないこと、E-cadherin は細胞底面付近の mature な細胞間接着部位に存在する一方で、PCDH10 は細胞頂端部分の immature な細胞間接着部位に存在することから、これらの因子が細胞の部位特異的に異なる力で働くことによって、細胞層全体の形態の変化を誘導していることも考えられる（図 39）。KLHL20 ノックダウンによって、細胞シート底面側にある、E-cadherin や N-cadherin のタンパク質量が減り、一方で、細胞頂端側での細胞間結合が強くなることによって、細胞シートが盛り上がるような形態になったのではないかと考えられる。KLHL20 ノックアウトマウスにおいて網膜上皮細胞層の形成に異常が見られること[51]、PCDH10 は神経細胞の軸索の収縮に参与することが報告されており[20]、細胞内で局所的に、E-cadherin などの classical Cadherin よりも強い結合を生じることで、このような現象を引き起こす可能性も推察される。

本研究では c-Abl などのチロシンキナーゼによって、PCDH10 に対するポリユビキチン鎖修飾量が増加することを明らかにした。これらのチロシンキナーゼは、成長因子などの様々な外的要因によって活性化されること、これらの刺激に応じて細胞接着や細胞層の形態が変化することが報告されており[57, 72]、刺激に応答しての細胞接着の制御に KLHL20、PCDH10 が関与する可能性が示唆された（図 37）。

3-4. KLHL20 による E-cadherin の発現量の調節について

KLHL20 をノックダウンすると、E-cadherin のタンパク質量が減少した。PCDH10 ノックダウンによっても同様の結果が得られ、KLHL20 と PCDH10 のダブルノックダウンによって、さらに E-cadherin のタンパク質量が減少した。このことから、KLHL20 と PCDH10 が何らかの機構で E-cadherin を安定化していると推察される。PCDH10 などが存在する immature な接着部位と E-cadherin などが存在する mature な接着部位に相互作用があることは細胞の形態変化、がん細胞の遊走、転移を理解していくうえで大変興味深い現象であり、この現象の解明は今後の課題である。

4. 結論

本研究では膠芽腫の腫瘍形成能に関わる因子を特定する目的で、腫瘍形成能の高い無血清培養細胞と、腫瘍形成能の低い血清培養細胞の遺伝子発現パターンを比較し、無血清培養時に高い発現を示すに発現量が高い因子を対象として研究を行った。この中でも、膜タンパク質 PCDH10 に着目し、詳細な解析を行った。

PCDH10 の機能を明らかにするため、shRNA を用いて膠芽腫検体由来細胞に内在性の PCDH10 のノックダウン実験を行った。この結果、PCDH10 ノックダウンによってアポトーシスが誘導され、細胞増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、ヌードマウスへの移植実験を行った結果、PCDH10 ノックダウンによって、*in vivo* においても細胞増殖が抑制され、膠芽腫細胞の腫瘍形成能が低下することを明らかにした。

PCDH10 の新たな機能を探索するため、酵母 two-hybrid スクリーニングを行い PCDH10 の細胞質ドメインと結合する新規因子の探索を行った。この結果、PCDH10 に対する新規結合因子として同定した KLHL20 について、*in vivo*、*in vitro* での結合を確認した。293FT 細胞を用いた *in vivo* ubiquitination assay の結果、KLHL20 依存的に PCDH10 のポリユビキチン修飾が亢進したことから、PCDH10 は KLHL20 複合体によるポリユビチン修飾の基質となることを明らかにした。また、内在性の KLHL20 のノックダウンによって、細胞膜上に存在する PCDH10 のエンドサイトーシスが抑制された結果、細胞膜上の PCDH10 のタンパク質量が増えることを明らかにした。KLHL20 ノックダウンによって、PCDH10 依存的に細胞間接着力が増大したことから、KLHL20 は PCDH10 の局在を制御することによって細胞間接着を調整していると考えられる。また、PCDH10 は典型的なカドヘリンである E カドヘリンとは異なる局在を示すことから、この細胞間接着の制御はアドヘレンスジャンクションとは異なるものであることを示した。

順位	遺伝子名	GB2 stem vs diff	GB3 stem vs diff	GB2-3平均	順位	遺伝子名	GB2 stem vs diff	GB3 stem vs diff	GB2-3平均
1	PMP2	1512.96	9744.00	5628.48	76	PCDH17	337.23	269.26	303.24
2	PMP2	9011.67	402.43	4707.05	77	C2orf55	422.80	181.78	302.29
3	AQP4	702.65	8291.33	4496.99	78	LOC285382	39.28	554.50	296.89
4	EDNRB	10.87	7783.67	3897.27	79	MAP2	27.05	565.77	296.41
5	NCAN	6983.33	298.77	3641.05	80	GPM6B	558.56	23.91	291.23
6	FAM107A	23.31	4086.50	2054.91	81	NRXN1	0.40	576.67	288.53
7	NTRK2	3363.57	339.61	1851.59	82	SOX2	164.37	409.74	287.05
8	RFX4	1149.00	2385.00	1767.00	83	MAP2	22.38	527.82	275.10
9	FAT3	3427.75	37.01	1732.38	84	CADM2	127.25	422.50	274.87
10	FABP7	1746.83	1203.65	1475.24	85	SEMA6D	15.73	525.06	270.40
11	CADM2	264.00	2231.00	1247.50	86	CRB1	494.33	41.97	268.15
12	ASCL1	2257.50	136.93	1197.21	87	EPHA3	60.08	466.00	263.04
13	SOX8	1737.89	502.61	1120.25	88	MGC33846	94.52	429.64	262.08
14	MPPED2	2070.43	46.59	1058.51	89	CNKSR2	504.67	14.84	259.75
15	S100B	68.92	2010.58	1039.75	90	CA14	417.68	101.44	259.56
16	AQP4	721.00	1176.00	948.50	91	SYT17	44.96	465.63	255.29
17	ASCL1	469.87	1411.54	940.71	92	KCNJ10	404.20	92.90	248.55
18	GRIA2	1314.50	531.29	922.89	93	GPM6A	386.02	107.41	246.71
19	TNFRSF19	4.32	1825.33	914.83	94	DIRAS2	21.00	458.33	239.67
20	PTPRZ1	709.66	1061.82	885.74	95	GNG4	439.60	24.30	231.95
21	AQP4	164.00	1606.00	885.00	96	GPM6B	420.24	42.27	231.25
22	FAM123A	1644.50	70.50	857.50	97	WSCD1	265.67	188.47	227.07
23	CHL1	101.34	1591.25	846.30	98	CPVL	34.62	414.80	224.71
24	OLIG1	386.51	1263.72	825.12	99	KIF1A	352.25	97.14	224.69
25	---	986.00	642.33	814.17	100	C9orf58	5.53	443.20	224.37
26	CTNND2	559.83	1046.75	803.29	101	AQP4	349.75	89.19	219.47
27	KLHDC8A	1277.70	294.37	786.03	102	DCX	108.47	327.70	218.08
28	TOX3	783.67	749.67	766.67	103	RNF157	9.37	421.53	215.45
29	HAPLN1	1009.33	427.00	718.17	104	C20orf103	408.48	19.24	213.86
30	LRRN3	0.06	1401.00	700.53	105	TSPAN7	19.25	407.67	213.46
31	CCND2	310.44	1006.91	658.68	106	GLDC	302.53	123.21	212.87
32	CCND2	420.50	878.88	649.69	107	SLAIN1	351.63	58.54	205.09
33	EPHA3	1145.17	145.24	645.21	108	PTPRD	17.91	388.33	203.12
34	RHOA	1275.80	10.19	643.00	109	COBL	309.38	93.37	201.38
35	ATP1A2	362.25	892.11	627.18	110	ELAVL3	128.22	268.63	198.42
36	SLC6A1	60.41	1156.25	608.33	111	BMP7	172.07	220.44	196.25
37	---	1003.00	177.00	590.00	112	---	351.63	33.92	192.77
38	SOX2	295.53	869.73	582.63	113	MYCN	321.30	57.36	189.33
39	LHFPL3	1158.50	1.41	579.96	114	DCX	111.57	259.83	185.70
40	CCND2	808.67	334.69	571.68	115	---	0.73	366.88	183.80
41	GPM6B	1069.87	26.88	548.38	116	PCDH10	301.10	64.92	183.01
42	CSPG5	160.25	926.00	543.12	117	---	260.50	94.86	177.68
43	SEMA6A	590.40	461.00	525.70	118	KCNQ2	124.53	228.08	176.30
44	AQP4	444.25	581.58	512.92	119	---	96.96	238.00	167.48
45	---	194.40	825.00	509.70	120	GPM6A	280.29	52.92	166.60
46	FABP7	642.54	371.25	506.89	121	NGFR	149.00	183.58	166.29
47	C10orf141	998.67	2.84	500.75	122	HEY2	248.92	81.94	165.43
48	OLIG2	96.21	883.87	490.04	123	---	182.60	135.50	159.05
49	GPM6A	896.47	83.58	490.02	124	GNG4	156.26	160.89	158.58
50	GRIA2	903.40	66.32	484.86	125	---	245.29	68.44	156.86
51	ELOVL2	927.25	27.11	477.18	126	ELAVL4	137.85	174.62	156.23
52	RRAGD	129.12	785.13	457.12	127	SOX2	140.82	170.56	155.69
53	MEGF10	4.45	903.20	453.83	128	NTRK2	204.17	96.75	150.46
54	LPL	106.95	790.00	448.48	129	FUT9	222.04	74.44	148.24
55	TOX3	144.33	743.33	443.83	130	HES5	16.71	270.80	143.75
56	LINGO1	173.45	711.50	442.48	131	MGC45438	10.39	276.42	143.40
57	---	822.33	60.04	441.19	132	SOX2OT	93.34	192.62	142.98
58	ALDH5A1	792.50	66.07	429.28	133	GPM6B	239.19	33.71	136.45
59	CSPG5	328.28	529.78	429.03	134	TOX3	103.46	165.20	134.33
60	CA2	46.82	805.57	426.20	135	FREM2	100.79	166.98	133.89
61	PCDH17	703.64	131.76	417.70	136	A2M	1.40	265.93	133.67
62	HEY1	19.38	806.07	412.73	137	NRXN1	0.06	265.27	132.67
63	ASCL1	691.67	57.36	374.51	138	ANGPT1	242.71	20.05	131.38
64	C1orf61	409.24	327.80	368.52	139	LRRC3B	3.64	257.25	130.45
65	TTYH1	188.47	539.85	364.16	140	ERBB3	30.16	229.77	129.96
66	RIT2	4.67	710.57	357.62	141	PNMA2	205.72	53.64	129.68
67	BBOX1	126.33	573.75	350.04	142	MPPED2	45.20	213.33	129.27
68	RTN1	685.10	3.55	344.33	143	TNFRSF19	3.60	252.22	127.91
69	BCAN	268.72	417.42	343.07	144	PHYHIPL	229.00	26.42	127.71
70	FAM5C	202.73	475.00	338.86	145	KCNJ16	108.15	145.34	126.75
71	FXYD6	25.18	647.57	336.37	146	KLHDC8A	102.96	150.24	126.60
72	IGSF11	272.13	397.71	334.92	147	KBTD11	50.90	202.00	126.45
73	SP8	194.56	425.50	310.03	148	LOC642891	207.23	42.17	124.70
74	TSPAN12	37.64	575.58	306.61	149	LPHN3	237.00	12.33	124.66
75	EDNRB	7.95	603.00	305.48	150	PEG3	71.63	176.05	123.84

表 1. 血清添加培養と無血清培養を行った際に発現変動する遺伝子のリスト
上位 150 プローブの遺伝子を示した。

	Total	PCDH10 (+)	PCDH10 (-)
No, n (%)	19 (100)	11 (57.9)	8 (42.1)
Women, n (%)	7 (36.8)	5 (45.5)	2 (22.2)
Median age (range), y	70 (34-83)	74 (39-83)	65 (34-76)
Median KPS (range), %	80 (50-100)	90 (50-100)	75 (50-90)
Median EOR (range), %	97.7 (5-100)	94.0 (5-100)	98.4 (40-100)
Methylated MGMT promoter, n (%)	8 (42.1)	5 (45.5)	3 (37.5)

表 2. 免疫染色を行った膠芽腫患者の詳細

PCDH10 の免疫染色を行った腫瘍組織切片を摘出した膠芽腫患者の詳細。略記は以下の通り。
 KPS (Karnofsky Performance Scale), EOR (extent of resection), MGMT (06-methylguanine-DNA methyltransferase)

Accession	Description	ΣCoverage	Σ# Unique Peptides	Σ# Peptides	Σ# PSMs	Score A2	Coverage A2	MW [kDa]
2318119	JNK kinase 2 [Homo sapiens]	15.27	6	6	8	21.20	15.27	47.5
300360580	inactive caspase-12 [Homo sapiens]	6.16	1	1	7	20.59	6.16	38.8
8439415	tryptophanyl-tRNA synthetase [Homo sapiens]	28.97	6	6	6	16.78	28.97	33.1
194384576	unnamed protein product [Homo sapiens]	13.99	1	4	5	17.17	13.99	47.4
	unnamed protein product [Homo sapiens]	14.60	4	4	5	15.12	14.60	51.8
119588792	tumor susceptibility gene 101, isoform CRA_e	11.89	4	4	4	9.61	11.89	43.3
74739631	RecName: Full=Cell division cycle protein 123 homolog	12.20	3	3	3	10.83	12.20	39.1
291084757	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	6.69	2	2	3	7.85	6.69	40.2
30089919	polymerase delta-interacting protein 3 isoform 2	11.73	3	3	3	8.46	11.73	42.9
203282370	Chain D, Crystal Structure Of Human Enolase 1	9.93	3	3	3	9.34	9.93	47.0
221043842	unnamed protein product [Homo sapiens]	7.52	3	3	3	6.84	7.52	48.0
6729803	Chain A, Heat-Shock 70kd Protein 42kd Atpase	10.79	3	3	3	7.60	10.79	41.8
194384098	unnamed protein product [Homo sapiens]	9.89	3	3	3	9.63	9.89	47.9
194377108	unnamed protein product [Homo sapiens]	28.57	3	3	3	7.68	28.57	17.0
21619816	TUBA1C protein [Homo sapiens]	12.92	3	3	3	9.80	12.92	36.6
40976956	unnamed protein product [Homo sapiens]	40.32	3	3	3	9.64	40.32	13.6

表 3. 質量分析を行った際、PCDH10 と結合する因子として検出されたタンパク質 Flag M2 抗体を用いて免疫沈降を行ったバンドにのみ存在したタンパク質名を示す。検出ペプチド数が 3 以上のタンパク質を示した。

遺伝子名	得られたクローン数
GGN	6
DYNLT1	5
KLHL20	3
RANBP9	3
TBCB	3

表 4. Two-hybrid スクリーニングで PCDH10 結合因子として同定されたタンパク質

PCDH10 の細胞内ドメインをベイトとして human testis library を用いて行った two-hybrid スクリーニングの結果。各遺伝子内の配列を持つプラスミドが 3 クローン以上から検出されたものを示した。

6. 材料と方法

6-1. 細胞培養

すべての細胞は、37°C、5%CO₂存在下で培養した。膠芽腫検体由来細胞株は、DMEM/F12培地 (GIBCO) に 20 ng/ml EGF (Wako)、20 ng/ml basic FGF (Wako)、B27 supplement (Invitrogen) を添加した培地で培養した。増殖アッセイ及びマイグレーションアッセイにはラミニンコートディッシュを用いて接着培養した細胞を用いた。膠芽腫検体由来細胞の血清添加培養には、DMEM/F12培地に、10% FBS を添加した培地を用いた。1ヶ月以上血清分化培地で培養した細胞をアッセイに用いた。293FT細胞、HEK293細胞は、DMEM培地(日水)に2 mM L-glutamine と10% FBS を添加した培地で培養した。不死化脳血管内皮細胞(hCMEC)はINSERMより供与して頂いた。BMVEC細胞及びhCMEC細胞はEBM2(Lonza)培地を用いて培養した。

6-2. マイクロアレイ解析

当研究室で樹立した2系統の膠芽腫細胞株(GB2、3)を血清添加培地、もしくは無血清培地を用いて培養し、マイクロアレイ(Affymetrix HG-U133P2)を用いて発現プロファイルを東大先端技術研究センターゲノムサイエンス分野(油谷研)との共同研究により取得した。各サンプルのデータは前処理として、低シグナルプローブの除去、log変換、標準化の操作を行った。

6-3. 膠芽腫検体

全ての膠芽腫検体組織切片及び膠芽腫検体由来細胞株の取得にはインフォームドコンセントに基づき手術によって摘出した腫瘍組織を用いた。検体を用いた全ての実験は金沢大学病院及び東京大学病院の倫理委員会の承認の下行われた。本研究に用いた検体標本は全て病理医の診断に基づいて分類を行った。

6-4. shRNA、siRNA

RNAiスクリーニングには東京大学理学系研究科、程研究室より供与して頂いたshRNAライブラリー及び、ambionのsiRNAライブラリーを用いた。

膠芽腫細胞を用いたノックダウン実験に使用したshRNAの配列は以下の通りである。

Luciferase : 5' -GATTCGAGTCGTCTTAATGT -3'

DsRed : 5' - GCCCCGTAATGCAGAAGAAGA-3'

human PCDH10#2: 5' -GTGCGTGGCAACGAAATGAAC-3'

human PCDH10#4 : 5' - GAGAAGAAGCTCAACATCTAT-3'

KLHL20によるPCDH10へのユビキチン修飾に関する実験には以下のsiRNAを用いた。

Control siRNA for KLHL20: silencer select negative control #2
siRNA KLHL20#1: silencer select (life technologies) S223741
siRNA KLHL20#S: silencer select (life technologies) S26051
Control siRNA for PCDH10: siGENOME Non-Targeting siRNA #3 (Thermo scientific)
PCDH10 : siGENOME Human PCDH10 (57575) siRNA#3 (Thermo scientific)

6-5. 組織免疫染色

ヒト組織切片の免疫染色

ヒト腫瘍組織は手術による摘出後、3.7%中性ホルマリンで固定を行った。パラフィンブロックから6 μ mの厚さの切片を作製し、脱パラフィン処理後10%PFAを用いて10分間後固定処理を行った。target retrieval solution (pH 6.0; Dako)をもちいて15分間電子レンジ処理を行い、賦活化を行った後、1時間以上室温放置して冷却した。0.3% H_2O_2 メタノール溶液を用いて室温で20分間内在性のペルオキシターゼの非働化を行った。5%スキムミルクブロッキング溶液(5%スキムミルク、0.1%Tween20をTBSに溶解)を用いて30分間室温でブロッキング処理を行った。ラットIgGをネガティブコントロールとして用いた。抗PCDH10抗体は抗体希釈用緩衝液(DAKO)を用いて100倍に希釈し、4 $^{\circ}$ Cで一晩1次抗体反応を行った。

ABC kit (VECTOR)を用いて免疫染色を行った。diaminobenzidine peroxidase substrate (Funakoshi)を用いて5-10分発色反応を行った。カウンター染色にはヘマトキシリンを用いた。明視野顕微鏡AX80(Olympus)を用いて画像を取得した。

6-6. マウス脳切片の免疫染色

死亡したマウスから脳を取り出し、3.7%中性ホルマリンで固定した後、ハイパーセンターXP (Thermo Shandon)を用いてパラフィン包埋した。その後、ディスペンシングコンソールIV (Tissue-Tek)を用いてブロックに成型し、RM2145 (Leica)で厚さ4 μ mの切片を作製した。脱パラフィン処理後、HE染色または免疫染色に用いた。脱パラフィン処理を行ったマウス脳切片はクエン酸バッファー(10mMクエン酸pH6.0)中で121 $^{\circ}$ C15分オートクレーブ処理を行った。オートクレーブ処理後、バッファーが入った槽ごと室温放置して切片を室温まで冷ました。0.2% Triton-X100/PBSを用いて浸透化処理後、3%過酸化水素水/PBSを用いて室温で5分間、内在性のペルオキシターゼの非働化を行った。その後、10% goat serum/PBSを用いて室温で15分、ブロッキング処理を行った。1次抗体は以下の抗体を用いた(GFP: Santa Cruz、Sc-8334; Ki67:Leica、NCL-Ki67-MM1)。1次抗体は10% goat serum/PBSで200倍希釈して用い、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。これらのサンプルにVECTASTAIN Elite ABC IgG Kit (VECTORLABORATORIES, INC)を用いてDAB染色を行った。具体的にはビオチン化抗IgG抗体をPBSで200倍に希釈し、室温で30分間反応させた後、室温で30分間ABC反応を行った。ImmPact DAB (VECTORLABORATORIES, INC)を用いて発色させ、その後ヘマトキシリン

染色液を用いて核染色を行った。パラフィン透徹処理後、Permount (Fisher chemicals) を用いて封入した。ヘマトキシリン・エオジン溶液 (MERCK) を用いて HE 染色を行った。ラビット IgG もしくはマウス IgG をネガティブコントロールとして用いた。明視野顕微鏡 AX70 (オリンパス) を用いて切片の写真を取得した。Ki67 インデックスを作製には、各サンプル 6 視野ずつ、それぞれ 1000 個の細胞をカウントして Ki67 陽性細胞の割合を算出した。

6-7. 使用したプラスミド

ウイルス作製

pENTR H1 (程先生より供与)、pENTR4 dual selection (life technologies)、pCMV-VSV-G-RSV-Rev (理研)、pCAG-HIVgp (理研)、CSII-CMV-MCS-IRES2-Venus (理研)、pENTR4 dual selection Flag-ubiquitine、pENTR4 dual selection lacZ、pENTR4 dual selection PCDH10-3XFlag

その他

pGBK T7 PCDH 10 ICD (a. a. 738-1040)、pGEX 5X-1、pGEX 5X-1 PCDH 10 ICD (a. a. 738-1040)、pcDNA3.1 Flag-Ubiquitine、pcDNA3.1 HA-KLHL20 及び各変異体、pcDNA3.1 myc-his A PCDH10

6-8. shRNA 発現レンチウイルスの作製と感染

shRNA 発現カセットを組み込んだ pENTR H1 ベクター、強制発現用コンストラクトを組み込んだ pENTR4 dual selection と GS-RfA-CG、CSII-CMV-MCS-IRES2-Venus を用いて LR 反応を行い最終ベクターを作製した。この最終ベクターを pCMV-VSV-G-RSV-Rev と pCAG-HIVgp と共に 293FT 細胞にトランスフェクションし、12 時間後に、B27 を添加した DMEM F12 に培地交換した。37°C で 72 時間培養した後、培養上清から超遠心 (113,000 × g、1.5 時間) によってウイルスを沈殿させ、PBS に希釈してウイルス液とした。感染は、細胞懸濁液とウイルス液を混合し、15 分おきに攪拌しながら 1 時間、吸着反応を行った。ウイルスベクターには目的のインサートの発現ユニットとは別に GFP 発現ユニットが組み込まれており、感染細胞は GFP の発現によって識別できる。

6-9. 定量的 RT-PCR

shRNA によるノックダウン実験を行う際には、RT-PCR を用いてノックダウン効率の確認を行った。細胞からの total RNA の抽出・精製には NucleoSpin RNA Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を使用した。350 μl RA1 (NucleoSpin) に溶解しマニュアルに従い精製した。500ng の RNA を鋳型として、PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa) によって cDNA に逆転写した。cDNA を鋳型として、それぞれの遺伝子に対して設計した Primer ペアと 2x Sybergreen master mix (Roche) を混合し、LightCycler480 (Roche) によって各遺伝子の発現量を定量

した。なお、PCR は以下のプログラムで行った。各遺伝子の発現量は、GAPDH をコントロールとして $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて解析した。

Denature 95°C 5 min.
PCR 95°C 5 sec.
 60°C 5 sec.
 72°C 10 sec.
Melting curve 95°C 5
 65°C 15
 98°C continuous
Cooling 25°C

使用した Primer の配列は以下の通りである。

GAPDH Fw: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH Rev: TGGTGAAGACGCCAGTGGA
CD133Fw: AGTGGCATCGTGCAAACCTG
CD133 Rev: CTCCGAATCCATTGACGATAGTA
PCDH10 Fw: AGGCCCTTCACAGCACTCT
PCDH10 Rev: GACTAGCATATCCTTTCCGTGTC

6-10. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖アッセイには Cell Titer Glo (Promega) を用いた。ウイルス感染後 3 日目に、ラミニンコートをした 96 ウェルディッシュの各ウェルに 2500 個ずつとなるよう細胞をまき直した。各時間の後に 50 μ l の培地に Cell Titer Glo 液 50 μ l を加えて溶解し、15 分間静置後、50 μ l をアッセイに用いた。蛍光の測定は ルミノメーター LB960 と MicroWin2000 software (Berthold) を用いた。各サンプル 4well ずつ解析を行い、平均をとった。

・ウェスタンブロッティング

調整したサンプルをポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行なった後、セミドライ方式で Immobilon Membrane (Millipore) にトランスファーした。トランスファー後のメンブレンは、3%スキムミルクもしくは 5%BSA を含んだ TBST バッファー (20 mM Tris-HCl pH7.5、150 mM NaCl、0.1% Tween20) ブロッキング処理を行なった。その後、TBST で 15 分 \times 2 回洗浄し、4%スキムミルク/TBST で希釈した抗体で 4°C で一晩振盪した。TBST で 15 分 \times 3 回洗浄して未反応の抗体を洗い流し、TBST で希釈した 2 次抗体で 1 時間、室温で振盪した。さらに TBST で 15 分 \times 3 回洗浄した後、NBT/BCIP (Promega) によって発色、または

Luminate Forte Western HRP Substrate を基質とした発光を LAS4000 mini (FUJIFILM) で検出した。使用した抗体と希釈倍率は以下の通り。なお、pAb はポリクローナル抗体、mAb はモノクローナル抗体を表す。

1 次抗体

Anti- α -tubulin mouse mAb (DM1A)、Calbiochem (CP06)、2000 倍
Anti-GAPDH mouse mAb (6C5)、Millipore (MAB374)、500 倍
Anti-FLAG mouse mAb (M2)、Sigma、5000 倍
Anti-HA 3F10、Roche、1000 倍
Anti-myc 9E10 mAb、Santa Cruz、1000 倍
Anti KLHL20 rabbit pAb、(抗原：a. a. 1-417、当研究室で作製)、500 倍
Anti PCDH10 rat mAb、平野先生より供与、5000 倍
Anti JNK pAb、Cell signaling、1000 倍
Anti p-JNK pAb、Cell signaling、1000 倍
Anti c-jun pAb、Cell signaling、1000 倍
Anti p-c-jun pAb、Cell signaling、1000 倍
Anti E cadherin mAb、transduction、2000 倍
Anti N cadherin mAb、upstate、2000 倍
Anti phosphotyrosine mAb、transduction、1000 倍
Anti integrin β 4 mAb

2 次抗体

Anti-mouse IgG AP conjugated、Promega、5000 倍
Anti-rabbit IgG AP conjugated、Promega、5000 倍
ECL anti-mouse IgG HRP conjugated、GE Healthcare、5000 倍
ECL anti-rabbit IgG HRP conjugated、GE Healthcare、5000 倍

6-11. シングルセルマイグレーションアッセイ

GB2 細胞を shRNA 発現ウイルスに MOI6 で感染させ 3 日後に、ラミニンコートをした 24 ウェルガラスボトムプレート (iwaki) に各ウェル 10^3 個となるようにまき直した。感染細胞は GFP を発現するため、5 分間隔で蛍光画像を取得し、合計 4 時間タイムラプス画像を取得した。画像取得の 2 時間前に培地交換を行った。蛍光顕微鏡は IX81 (Olympus) を用い、CCD カメラ CoolSNAP K4 (Photometrics) を用いて撮影した。ステージは thermal controller INU (TOKAIHIT) をもちいて 37°C、5% CO₂ に保った。細胞の軌跡の作成及び運動速度の解析は IMARIS Track (BitPlane) を用いて行った。各サンプル間の細胞速度の比較は U 検定を用いた。

6-12. 統計解析

ボックスプロットの作成およびログランクテストは統計ソフト R を用いて行った。ボックスの上側、下側はそれぞれ 75%と 25%値を示す。ボックスの上部のドットは外れ値をしめす。ボックスの上下のバーは最大値もしくは最小値、外れ値が存在する場合は 75%値の 1.5 倍の値を示す。

6-13. ラミニンに対する接着の評価

GB2 細胞に shRNA 発現ウイルスを MOI6 で感染させた後、5 日目にアッセイを行った。enzyme free cell dissociation buffer (Gibco) を用いて細胞を剥がし、ラミニンもしくは 1% BSA を用いてコーティングを施した 96 ウェルディッシュに 5.0×10^3 個ずつ細胞をまいた。細胞をまきなおしてから 1 時間後に培地を用いて 1 回ウォッシュを行い、Cell titer Glo assay を行って接着細胞数を測定した。各サンプル 4 ウェルずつ調整し、活性の平均値を算出した。

6-14. 浸潤アッセイ

24-well Biocoat Matrigel invasion chamber (BD Biosciences) を用いて浸潤アッセイを行った。GB2 細胞に shRNA 発現ウイルスを MOI3 で感染させた後、DMEM F-12 培地を用いて一晚スターブ処理を行った。あらかじめ DMEM F12 培地を用いて湿潤させておいたマトリゲルチャンバーの上側に 1.0×10^5 個の細胞をまいた。チャンバーの上側には成長因子無添加の DMEM F-12 培地を、下側のウェルには 10%FBS を含む DMEM F-12 培地を添加した。37°C で 24 時間培養を行い、細胞をチャンバーの底面に向けて浸潤させた。Cell Titer Glo アッセイを行い、チャンバーの底面裏側に浸潤した細胞数を測定した。また、細胞を 24 時間浸潤させた後、チャンバーをメタノール固定して HE 染色を行った。

6-15. アネキシン V アッセイ

GB2 細胞に shRNA 発現ウイルスを MOI3 で感染させた後、3 日目に細胞をまき直した。6 ウェルディッシュに 1.0×10^5 個の細胞をまき、5 日後に AnnexinV assay を行った。AnnexinV-biotin kit (MBL)、streptavidin-APC (invitrogen) を用いて染色を行い、flow cytometer Canto II (BD Bioscience) を用いて解析を行った。FSC、SSC の値を用いてゲートを行い、少なくとも 5.0×10^3 細胞を解析し、APC 陽性画分に含まれる細胞の割合を算出した。データの解析には FlowJo 8.8.7 (TreeStar, Ashland, OR) を用いた。

6-16. スフィア形成アッセイ

ウイルス感染後 3 日目に 96well ウェルディッシュに各細胞数の細胞をまき直した。まきなおしてから 2 週間後 In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) を用いて sphere の GFP 蛍光画像を撮影し、Developer 1.9.1 software (GE Healthcare) を用いて解析を行った。

1well に含まれる全てのスフィアの個数をカウントして平均をとった。各サンプル 6well ずつ解析を行った。この際、大きさと真円率であらかじめゲートを設定することで、死細胞の残骸を除き、スフィアのみを測定の対象とした。

6-17. 免疫不全マウスへの移植

shRNA 発現ウイルスを GBM16 細胞に感染させた後、2 目に細胞を一部回収して RNA を抽出し、前述の通り real-time PCR を用いて各遺伝子の発現抑制効率の確認を行った。各遺伝子の発現抑制を確認できた細胞について、生細胞数が 5×10^3 個/ μ l になるよう DMEM F12 を用いて調整し、免疫不全マウスに移植した。免疫不全マウスには、BALB/cA-nu/nu の雄 5~6 週齢を用いた。マウスをネンプタールによって麻酔後 (1 mg/kg)、大脳皮質 (ブレグマより 1 mm 前方、2 mm 右方、頭蓋表面より深さ 3 mm) に細胞懸濁液を 2 μ l ずつ注入した。

6-18. トランスフェクション

293T 細胞、293FT 細胞へのトランスフェクションには、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を、プロトコールに従い使用した。

6-19. 質量分析

293T 細胞に Flag タグ標識した全長の PCDH10 を強制発現し、Triton lysis buffer (1% TritonX-100, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10mM NaF, 100 μ M sodium vanadate) を用いて溶解して 15000rpm で 30 分遠心を行い上清を回収した。6well ディッシュ 1well 分の細胞ライセートに 5 μ l の FLAG M2 conjugated magnetic beads (Sigma) を加え、4°C で 2 時間以上転倒混和した。Wash buffer を用いて wash を行った後、elution buffer (500 μ g/mL FLAG peptide with TBS) を 20 μ l 加え、氷上で 1 時間静置して溶出を行った。18 μ l のサンプルと 6 μ l の 4X SDS buffer を加え 95°C で 10 分間ボイルした。5-20%グラディエントゲルを用いてサンプルを SDS ページした後、SilverQuest キット (Invitrogen) を用いて銀染色を行った。

ゲルからバンドを切出し、1 mm 角に刻みマイクロチューブに移した。脱色後、10 mM DTT in 100mM ammonium bicarbonate を 50 μ l 加えて、56°C で 1 時間インキュベートした。DTT 溶液を除去し、55 mM ヨードアセトアミド in 100mM ammonium bicarbonate を 50 μ l を加えて遮光し、タッピングの後、室温で 1 時間置いた。溶液を除去し、アセトニトリルを 100 μ l 加えてよくタッピングする。ゲル片の脱水が確認できたら、トリプシン溶液 (25 ng/ μ l Trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate) (Trypsin Gold, Mass Spec Grade / Promega) を 10 μ l 加えた。ゲル片がトリプシン溶液で完全に膨潤した後、染み込まなかったトリプシン溶液を除去し、50 mM ammonium bicarbonate を加え、37°C で 6 時間以上インキュベートした。

溶液は回収用の別のチューブに移した。ゲル片に 0.1% TFA in 50% アセトニトリルを 20

μl を添加し、マイクロミキサーで 20 分間攪拌の後に、溶液を先述の回収用チューブに回収した。この操作を、ゲル片が完全に脱水するまで繰り返した。最後に遠心濃縮装置を用いて溶液が約 20 μl になるまで濃縮し、質量分析用サンプルとした。

サンプル中に含まれるタンパク質の同定には液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC/MS/MS) 装置を用いた。タンパク質同定においては、トリプシン消化によって得られた複数種類のポリペプチドのアミノ酸配列を知ることが必須である。そこで本論文では、高分子の詳細な情報を得る際に有用なタンデム質量分析法 (MS/MS 法) を使用し、トリプシン消化産物のアミノ酸配列を調べた。

MS/MS 法について以下に記述する。質量分析装置は一般にイオン化室、質量分析部、イオン検出器からなる。UPLC から送られたサンプルは荷電平衡状態でイオン化プローブに導入される。生成したイオンは電場を固定した MS1 に導入することで、特定の m/z を持つプリカーサーイオンのみが選択的に通過する。固定した電場によって選別されたプリカーサーイオンは気体分子と衝突することでフラグメントイオンに解離 (衝突誘起解離) し、フラグメントイオンのスペクトルが測定される。ここで得られた各フラグメントイオンの m/z 差はアミノ酸残基の質量に相当するため、マススペクトルを解析することでプリカーサーイオンのアミノ酸配列を調べることができる。本研究では 3 分割されたリニアイオントラップ、デュアル検出器を有する四重極型リニアイオントラップ質量分析計 (LTQ VELOS ETD, Thermo Fisher Scientific) で質量分析を行い、タンパク質同定には Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

LC は ADVANCE nano UHPLC (Michrom Bio Resources) を使用した。サンプルをカラムにロードした後、0.1% ギ酸 in H_2O (バッファ A) を 95%、0.1% ギ酸 in アセトニトリル (バッファ B) を 5% で溶出を開始した。流速は 500 nl/min で、開始後 0 分から 20 分の間にバッファ B 割合を 35% まで線形に上げた。開始後 20 分から 21 分でバッファ B を 95% に上げ、21 分から 24 分まで 95% を維持した。サンプル溶出後、24 分から 25 分までの間にバッファ B 割合を 95% から 5% まで下げ、開始後 25 分から 10 分間はバッファ A 割合 95%、バッファ B 割合 5% でカラムの平衡化を行った。上記のプロトコルに従い、1 サンプルにつき 35 分の測定を行った。

エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) は大気圧イオン化の一種で、大気圧化でサンプルをイオン化できる。UPLC から送られたサンプルは極性溶媒に溶解し荷電平衡の状態、電圧を印加したステンレスキャピラリへと導入される。キャピラリから大気圧下に噴霧された液体は脱溶媒され、帯電した試料 (気相イオン) のみが静電引力と真空の複合効果によって質量分析計の内部へと輸送される。本論文では、正に帯電した気相イオンを生成し電位勾配で気相イオンを誘引する「ポジティブイオンモード」を採用した。キャピラリ印加電圧を 1.6–2.0 kV、加熱キャピラリ (イオントランスファーチューブ) 電圧を 46 V に設定した。

イオントラップとは、荷電粒子を限られた空間に長時間閉じ込めるための装置のことで、その多くは高周波電場を用いる高周波イオントラップ (Paul トラップ) と静磁場を用いる

Penning トラップに分類される。リニアイオントラップは棒状の高周波電極と終端の DC 電極で構成されている。径方向の閉じ込めは高周波電解で行い、軸方向の閉じ込めは直流電解で行う。つまり安定に振動するイオンは外に出ることなく内部にとどまる。リニアイオントラップでは、イオン貯蔵、イオン選択、イオンの解離(衝突誘起解離)を電極に印加する電圧、ヘリウムガスで制御する。リニアイオントラップは 12mm, 37mm, 12mm の長さに 3 分割されている。全面・背面部の電位より中央部の電位を低下させることでイオンをトラップする。トラップに導入された様々な質量のイオンは、スキャンアウトの際、 m/z の昇順にトラップから放出される。イオン検出システムの方角へのイオンの動きを刺激するために出口ロッドに電圧を印加してイオンの分離を行う。ロッドに印加される交流周波数が(その質量に依存する)捕獲されたイオンの共鳴周波数に等しいときには、イオンの運動エネルギーを得る。印加電圧の大きさが十分に大きく、イオンが十分な時間が与えられている場合、イオンは、イオン検出系(X 方向)の方角に質量分析器から排出される。排出されたイオンはトラップの各側にある変換ダイノードを打つことで検出される。分離したイオン(プリカーサーイオン)に対しヘリウムガスにて衝突誘起解離によりフラグメントイオンを得る。フラグメントイオンはフルスキャン時と同じように変換ダイノードを打ち検出される。本実験では MS1 フルスキャンの検出範囲を m/z 450-1600 とし、MS1 イオン強度の Top 10 に対し MS/MS を取得した。

得られた MS データを Proteome Discoverer 1.4(Thermo Fisher Scientific)上で既存のデータベースと照合することで、試料中のタンパク質同定を行った。データベース検索エンジンとして SEQUEST を使用した。検索に供するスペクトル抽出条件およびデータベース検索条件は以下の通りである。

-スペクトル抽出条件

Precursor Selection	Use MS1 Precursor
Min. Precursor Mass	350 Da
Max. Precursor Mass	5000 Da
Min. Peak Count	1
Min. Collision Energy	0
Max. Collision Energy	100

-SEQUEST 検索条件

Protein Database	Human Uniprot 2013.10
Enzyme Name	Trypsin
Max. Missed Cleavage Sites	2
Min. Peptide Length	6
Max. Peptide Length	144

Precursor Mass Tolerance 2 Da
Fragment Mass Tolerance 0.8 Da
Dynamic Modification Oxidation (Met)
Static Modification Carbamidomethyl (Cys)

6-20. 使用した薬剤

購入元、溶媒、濃度は、以下の通りで使用した。

SP600125 : Sigma、DMSO、10 μ M。

6-21. チューブフォーメーションアッセイ

24well プレートの各ウェルに 100 μ l のマトリゲル(matrigel growth factor reduced) (BD) を注いだ後、37°Cで1時間放置して固めた。5.0X10⁴ 個の細胞をまき、24 時間後に明視野顕微鏡を用いて画像を取得した。

6-22. hCMEC と GB2 細胞の共培養

24well プレートの各ウェルにスライドガラスを入れた後 1.5X10⁵ 個の hCMEC 細胞をまいた。次の日、コンフルエントになった hCMEC を PBS(+) (1mM CaCl₂、0.5 mM MgCl₂) で 2 回 wash を行い、各ウイルスを感染させた GB2 細胞を 5.0X10⁴ 個まいた。GB2 細胞をまいてから 24 時間後に 3.7%中性ホルマリンで固定した後、TOPRO3 を用いて核染を行った。PBS にて wash を行った後、ProLong[®]Antifade(invitorogen) を用いて封入を行い、共焦点顕微鏡システム FV1000(Olympus) を用いて画像を取得した。GFP の蛍光画像と TOPRO3 の蛍光画像をマージした後、画像解析ソフト ImageJ を用いて解析を行った。その際以下のマクロを使用した。
run("Threshold...");run("Make Binary");run("Analyze Particles...", "size=100-
Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display exclude include")。

6-23. 酵母 two-hybrid スクリーニング

Matchmaker two-hybrid system(Clontech) を用いてスクリーニングを行った。pGBK T7 を用いて PCDH10 の細胞内ドメイン(a. a. 738-1040)と GAL4 の DNA 結合領域の融合たんぱく発現ベクターを作製し、ベイトとして用いた。Human testis library (Clontech) を用いてスクリーニングを行いロイシン、トリプトファン、ヒスチジン飢餓耐性のコロニーをピックアップした。また、X-GAL を用いて青白セレクションを行い、青色のコロニーをピックアップした。スクリーニングで陽性となったコロニーはプラスミドを回収したのち、大腸菌 DH5 α にトランスフォーメーションを行って Amp プレートにまいた。37°Cで一晩インキュベートし、生えてきたコロニーからプラスミドを抽出してシーケンス解析を行い、コードしている配列情報を得た。これらの配列を用いて BLAST 検索を行い、各配列が含まれる遺伝子の情報を得た。

6-24. GST プルダウンアッセイ

pGEX 5X-1 に PCDH10 の細胞内ドメイン (a. a. 738-1040) をクローニングし、大腸菌 BL21 株を用いてたんぱく質を発現させた。37°C にて一晩前培養を行い、1mM IPTG を加えて 37°C 1 時間インダクションを行った。遠心により回収した大腸菌ペレットは BufferA (50mM Tris-HCl pH8.0、0.5mM EDTA、400mM NaCl、5mM MgCl₂、5% glycerol、0.1mM PMSF、0.1mM DTT) に 0.5% NP40、5mM MgCl₂ を添加したものに懸濁してソニケーションにより破碎し、15000 X g で 1 時間遠心した後上清を回収した。BufferA で平衡化した GST-sepharose を加え 4°C で 1 時間転倒混和した。その後、WE バッファー (20mM Tris HCl pH7.5、2mM MgCl₂ 1mM DTT) を用いて 5 回ウォッシュを行い、プルダウンアッセイに用いた。GST 融合たんぱくを吸着したビーズは希釈後 SDS サンプルバッファーを加え濃度既知の BSA と共に SDS ページを行い、CBB 染色にて定量を行った。pcDNA3.1(+) にクローニングした HA-KLHL20 を鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* translation システム、TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems (promega) を用いて *in vitro* translation を行った。³⁵S-メチオニン (perkin elmer) で RI 標識を行った。2 μg の GST たんぱくと *in vitro* translation を行った反応液 10 μl を混合し、binding buffer (20mM Tris HCl pH8.0、150mM NaCl、5mM EDTA、10% glycerol、1% Triton X-100、1mM DTT) 中で一晩 4 °C で転倒混和した。希釈バッファー (10 mM Tris-HCl pH8.0、140 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% Triton X100) で 5 回、ビーズを洗浄した。さらに TEN バッファー (10 mM Tris-HCl pH8.0、140 mM NaCl、1 mM EDTA) で 1 回洗浄し、2x サンプルバッファーを加えて 95°C で 3 分間煮沸した。SDS ページを行った後、ゲルドライヤーにてゲルを乾燥させ、X 線フィルムを用いて一晩感光を行った後、FLA-7000 (GE healthcare) を用いて画像取得した。

6-25. 免疫沈降

調整した細胞ライセートに 1 μg~3 μg の抗体を加えて 4°C、2 時間~0/N で転倒混和した。その後、平衡化した Protein A Sepharose (GE Healthcare) を加え、30 分転倒混和した後、希釈バッファー (10 mM Tris-HCl pH8.0、150 mM NaCl、1% Triton X-100) で 5 回、ビーズを洗浄した。さらに TN バッファー (10 mM Tris-HCl pH8.0、140 mM NaCl) で 1 回洗浄し、2x サンプルバッファーを加えて煮沸した後、遠心した上清を SDS-PAGE によって分離し、ウェスタンブロッティングでタンパク質を検出した。

6-26. *in vivo* ubiquitination assay

293FT 細胞に Flag-ubiquitin、PCDH10-myc、HA-KLHL20 もしくは KLHL20 変異体発現ベクターをトランスフェクションし 24 時間後にセルライセートを回収した。細胞は SDS lysis buffer (1% SDS、20 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、10mM NaF、100 μM sodium vanadate、10mM *N*-ethylmaleimide) をもちいて溶解後、9 倍の体積の Triton lysis buffer (1% Triton X-100、20 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、10mM NaF、100 μM sodium

vanadate, 10mM *N*-ethylmaleimide) を加えた。1mg のライセート、2.5 μ g 抗 myc タグ抗体 (9E10) を用いて免疫沈降実験を行った。

6-27. 膜タンパク質の定量とエンドサイトーシスアッセイ

細胞を 4°C に冷却した PBSb(+) (1mM MgCl, 0.1mM CaCl₂ in PBS) を用いて 1 回ウォッシュした後、ビオチン化バッファー (0.5mg/ml EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin(thermo) in PBSb(+)) を用いて 4°C で 20 分膜タンパク質のビオチン化を行った。ブロッキングバッファー (50mM NH₄Cl in PBSb(+)) を用いて 4°C で 5 分ブロッキングを行った後、氷冷した PBSb(+)) を用いて 2 回ウォッシュを行い細胞を回収した。エンドサイトーシスアッセイには膜タンパク質のビオチン化を行った後、DMEM 10%FBS 培地を添加し、4 時間 37°C で培養を行った後、ストリッピングバッファー (60mM l-glutathione, 83mM NaCl, 83mM NaOH, 10%FBS in PBSb(+)) を用いて 4°C で 20 分 2 回還元反応を行い、細胞表面の膜タンパク質のビオチン修飾を剥がした。30 μ l の SDS lysis buffer を添加後、270 μ l の Triton lysis buffer を添加して溶解した。ソニケーション後遠心を行い、上清を回収して反応に用いた。200 μ l を Triton lysis buffer にて平衡化したアビジンビーズ (thermo) を 15 μ l 添加して 4°C 一晩ローテーションを行った。Triton lysis buffer を用いて 5 回、TN バッファーを用いて 1 回ウォッシュした後、2XSDS サンプルバッファーを添加し、95°C で 3 分ボイルした。ウエスタンブロットを行い、プルダウンされてきたタンパク質の定量を行った。

6-28. クランプアッセイ

RNAi MAX (invitrogen) を用いて 293FT 細胞に 5pM ずつ siRNA をトランスフェクションし、96 時間後にクランプアッセイを行った。12 ウェルディッシュに 293FT 細胞を 1.5×10^5 個/well となるように調整し、リバーストランスフェクション法を用いてトランスフェクションした。細胞は Mg⁺、Ca²⁺ を含んだ PBS(+) (1mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂) を用いて 1 回 wash した後、500 μ l の PBS (+) を加え、スクレーパーで細胞を培養皿の底からかきとり、p-1000 チップを用いて 20 回ピッペッティングを行った後、クランプ数をカウントした。総細胞数 (N_c) を、クランプ数 (N_p) で割りこみ、1 クランプに含まれる細胞数 (N_c/N_p) を算出した。

6-29. 培養細胞の免疫染色

スライドガラスを PBS を用いて 50 希釈したコラーゲン (KOKEN) で 1 時間室温でコーティングして用いた。12well dish に 293FT 細胞を 8.0×10^5 個でまき 24 時間後にトランスフェクションを行った。タグ標識タンパク質の染色には、トランスフェクション後 24 時間で、siRNA ノックダウン後の内在性のタンパク質の染色にはトランスフェクション後 96 時間で、37°C の PBS(+) (1mM CaCl₂, 0.5mM MgCl) を用いて wash を行い、3.7% 中性ホルマリン溶液を用いて 37°C で 15 分固定を行った。0.02% TritonX-100 を PBS(+) に溶解した溶液を用いて室

温で 15 分間浸透化を行った。10% Goat serum (DAKO) を用いて室温で 30 分ブロッキングを行った。1 次抗体は以下のものを用いた。

anti PCDH10 5G10 : 100 倍

anti E cadherin (transduction) : 100 倍

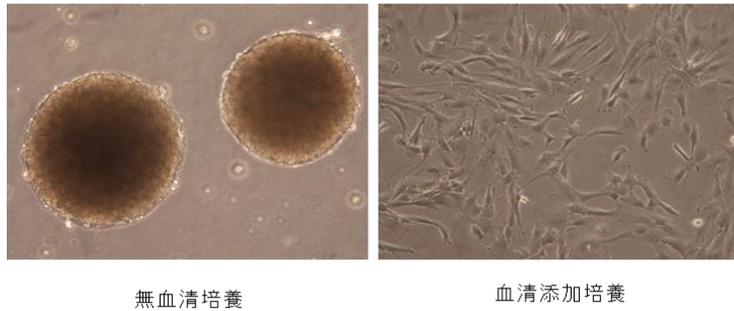
anti N cadherin (upstate): 500 倍

4°Cで一晩、1 次抗体反応を行った。2 次抗体は Alexa488 もしくは 594 標識された抗マウス、ラット、ラビットの各抗体 (life technologies) を 10% goat serum PBS(+) に 200 倍希釈して、室温で 1 時間反応を行った。1 μ M hoechst 33342 を用いて室温にて 15 分間核の染色を行った後、PBS(+) を用いて 2 回ウォッシュを行った。ProLong Gold antifade reagent(life technologies) を用いて封入し、共焦点顕微鏡システム FV1000(Olympus) を用いて画像を取得した。

6-30. in vivo、in vitro phosphorylation assay

In vivo phosphorylation assay では、293FT 細胞に PCDH10-myc と HA-Abl 発現ベクターをコトランスフェクションして 24 時間後に細胞を回収した。In vitro phosphorylation assay では 293FT 細胞に PCDH10-myc 発現ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収した。SDS lysis buffer を添加後、9 倍の体積の Triton lysis buffer を添加して溶解した。ソニケーション後遠心を行い、上清を回収して反応に用いた。1mg のタンパク質ライセートを免疫沈降に用いた。In vivo phosphorylation assay では 2.5 μ g の抗 myc タグ抗体を用いて免疫沈降を行った後、ウォッシュバッファー(10mM Tris-HCl pH8.0, 150mM sodium chloride)を用いて 5 回、TN バッファーを用いて 1 回ウォッシュを行い、SDS サンプルバッファー添加し、95°Cで 3 分ボイルしてウエスタンブロッティングを行った。In vitro phosphorylation assay では免疫沈降後、ウォッシュバッファーを用いて 3 回、1X kinase buffer (50 mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100 μ M EDTA pH 7.5, 1mM DTT, 100 μ M ATP) を用いて 2 回ウォッシュを行った。Protein A beads に結合した基質抗体の複合体を recombinant Abl (Calbiochem) と混合して、30°Cで 30 分反応を行った。反応後 SDS サンプルバッファー添加し、95°Cで 3 分間ボイルしてウエスタンブロッティングに用いた。

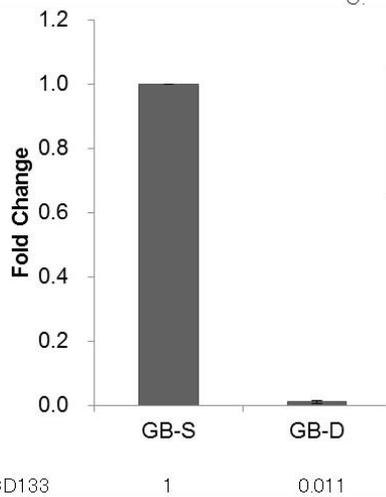
A.



無血清培養

血清添加培養

B.



C.

	GB-S	GB-D
4ヶ月生存率	0/4	3/3

図 1 : 検体由来膠芽腫細胞の主な性質

(A) 無血清培地、血清添加培地を用いて培養した GB2 細胞の光学顕微鏡写真。GB2 細胞を無血清培養すると神経幹細胞様のスフィアを形成して（左図）増殖した。GB2 細胞を血清添加培地を用いて培養すると培養皿に接着した（右図） (B) リアルタイム PCR による、CD133mRNA 量の解析。血清添加培養細胞（GB-D）に比べ、無血清培養細胞（GB-S）では CD133 mRNA の発現量が極めて高かった。 (C) ノードマウスに同所移植を行った際の 4ヶ月生存率。GB-S 細胞は GB-D 細胞よりも高い腫瘍形成能を持つ。ノードマウス頭蓋内に GB-S 細胞を同所移植すると、速やかに腫瘍を形成した。

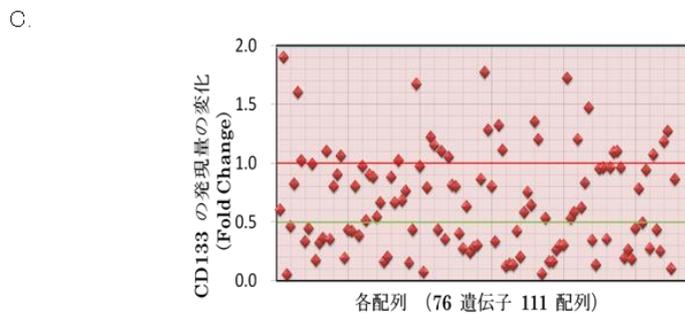
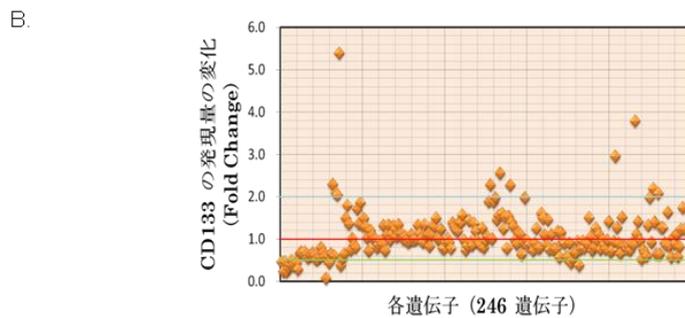
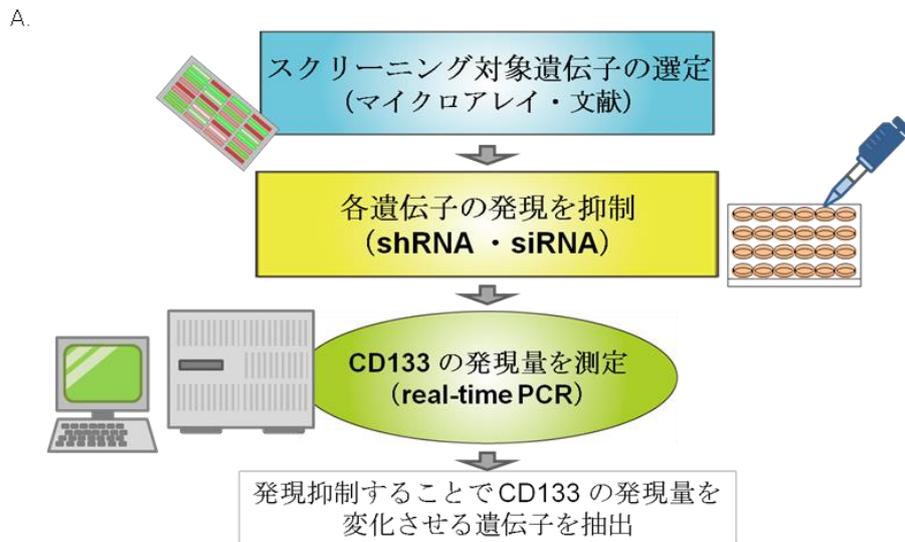


図 2 : スクリーニングの概要と結果

(A) スクリーニングの概要。(B, C) RNAi を用いて各遺伝子をノックダウンした際の CD133 mRNA の発現量の変化。(B) siRNA を用いて 246 遺伝子、(C) shRNA を用いて 76 遺伝子 について検討した結果、発現抑制によって CD133 mRNA の発現量を 0.5 倍以下に変動させる 52 遺伝子、または 2 倍以上に変動させる 11 遺伝子を同定した。

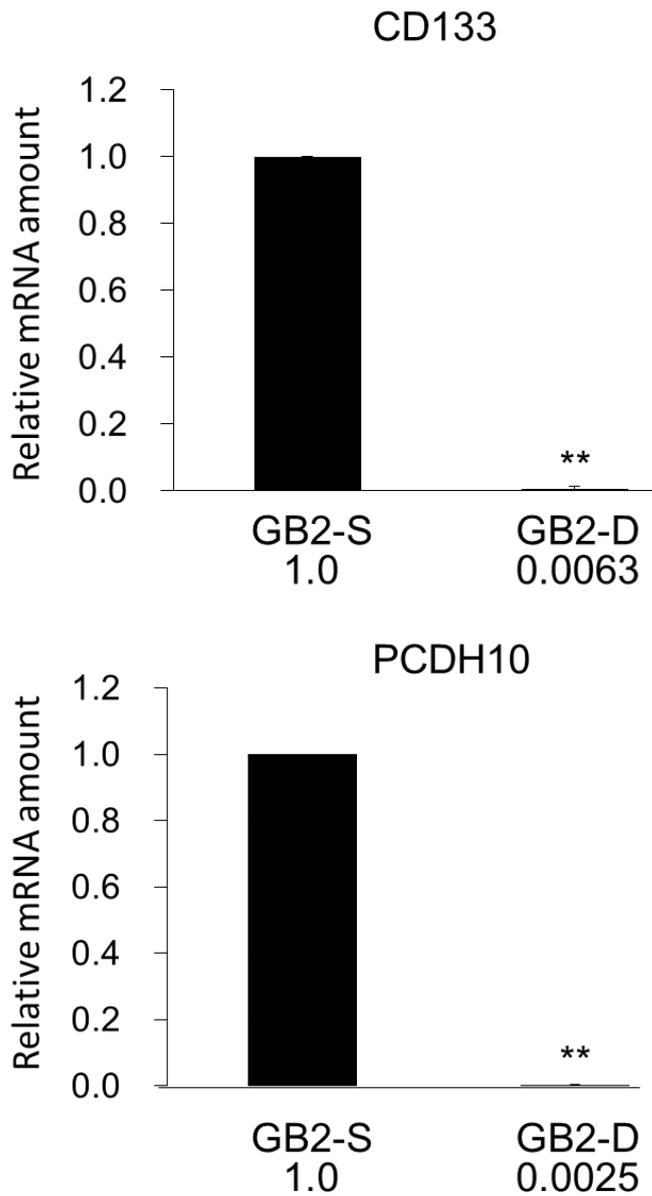


図 3. PCDH10 は GB2 細胞の無血清培養株で高い mRNA 発現量を示す

無血清培養を行った GB2 株 (GB2-S) と血清培養を行った GB2 株 (GB2-D) から mRNA を抽出しリアルタイム解析を行った。HPRT をコントロールとして CD133 及び PCDH10 の mRNA 量を $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて解析した結果を示す。3 回分の実験の平均値 $\pm SD$ 。

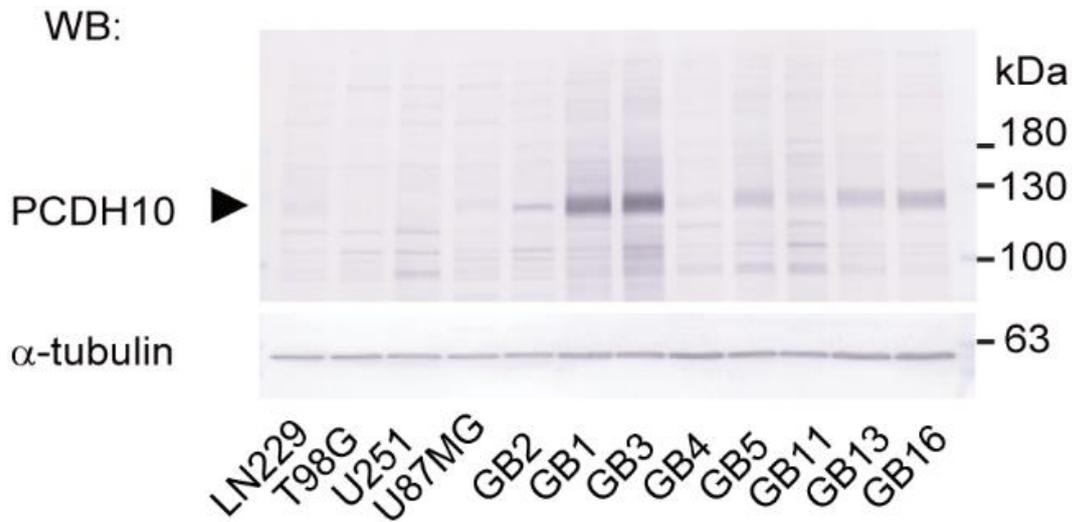


図 4. PCDH10 は膠芽腫検体由来細胞株において高いタンパク質発現量を示す

血清添加培地を用いて培養した膠芽腫細胞株（LN229, T98G, U251, U87MG）と、無血清培養の膠芽腫検体由来細胞株（GB1-16）よりタンパク質を抽出しウエスタンブロットを行った結果。
 $20 \mu\text{g}/\text{lane}$

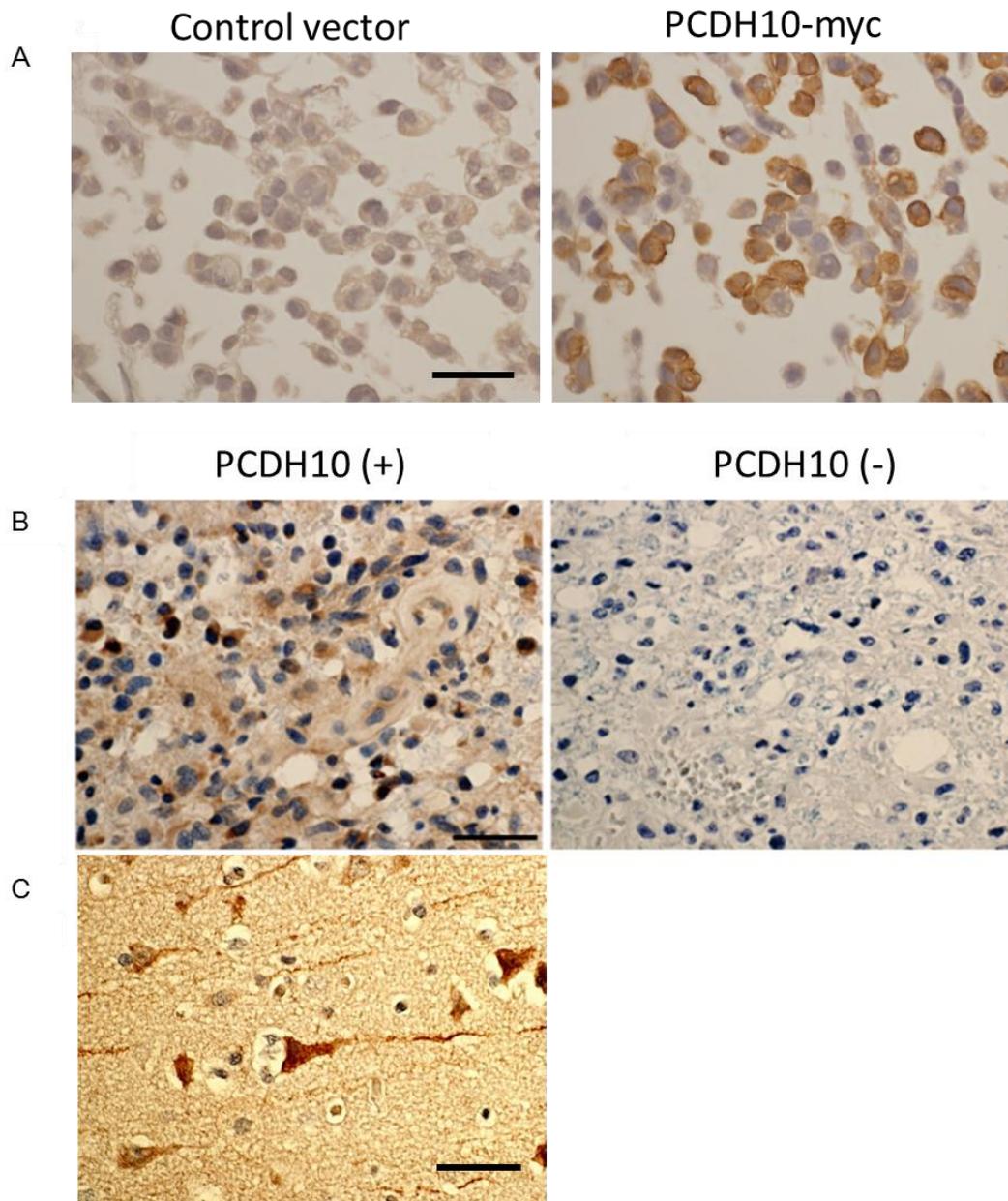


図 5. 膠芽腫検体由来腫瘍組織の腫瘍細胞で PCDH10 が発現している

(A-C) PCDH10 抗体を用いてパラフィン切片の DAB 染色を行った結果。核はヘマトキシリンを用いて染色した。茶色い部分が DAB 染色陽性の細胞。(A) 293FT 細胞に PCDH10-myc を強制発現してセルブロックを作製し、パラフィン切片を作製して染色を行った結果。(B) 膠芽腫検体由来の腫瘍組織切片を用いて免疫染色を行った結果。PCDH10 陽性と陰性の腫瘍の代表例を各 1 例ずつ示す。(C) ヒト脳正常組織切片の免疫染色像。スケールバー：20 μm

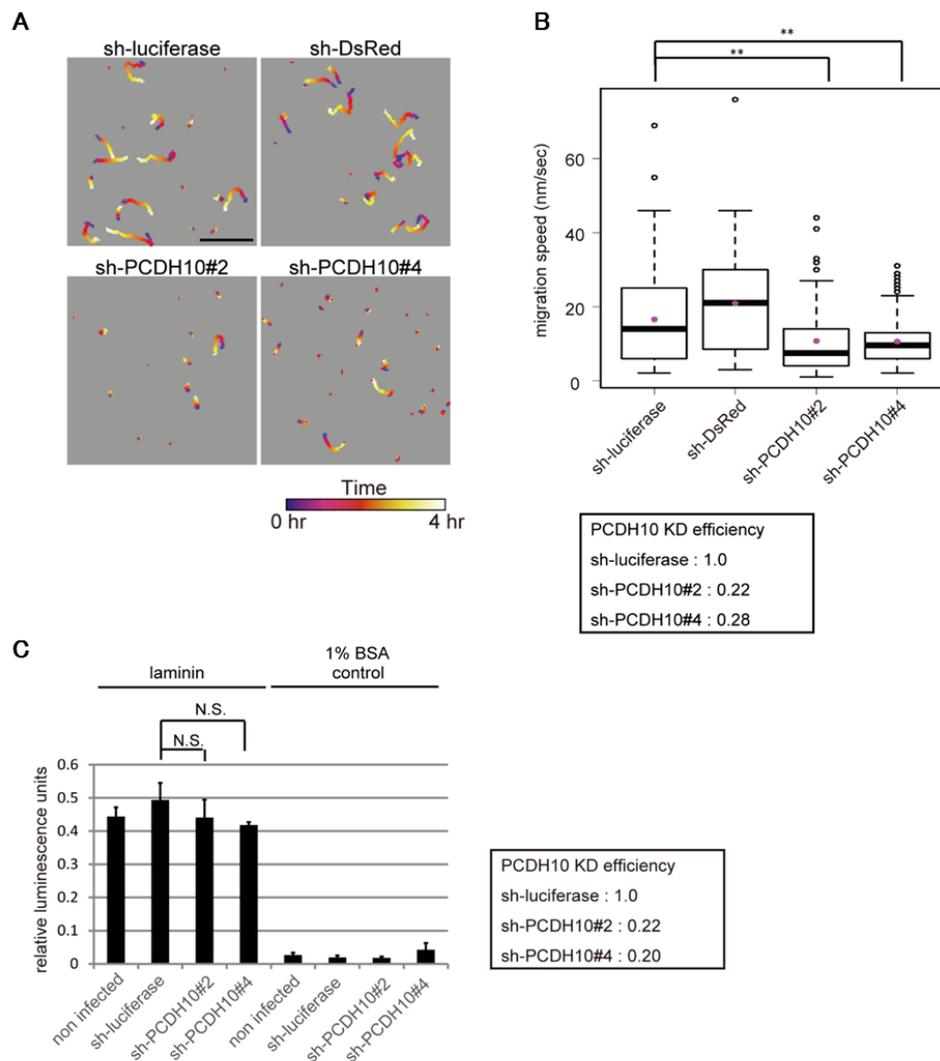


図 6. PCDH10 ノックダウンによって GB2 細胞の運動能が低下する

(A, B) シングルセルマイグレーションアッセイを行った結果。GB2 細胞に各 shRNA を発現するウイルスを感染させ、細胞運動への影響を調べた。CCD カメラを用い、ライブセルイメージングを行った。5 分間隔で 4 時間、蛍光写真を撮り解析を行った。(A) 各サンプル代表的な 1 視野における細胞の軌跡。スケールバー：400 μ m。(B) 観測した各細胞の運動速度。各サンプル 12 視野ずつ解析を行った。(sh-luciferase n=140, sh-DsRed: n=131, sh-PCDH10#2: n=138, sh-PCDH10#4: n=158) (C) ラミニンに対する GB2 細胞の接着性の評価。各 shRNA を発現させた GB2 細胞をラミニンもしくは 1%BSA(control) でコーティングを行ったディッシュにまき、1 時間後に接着している細胞数を Cell Titer Glo アッセイで測定した。接着細胞数ををまきなおし時の総細胞数で割った値を示す。

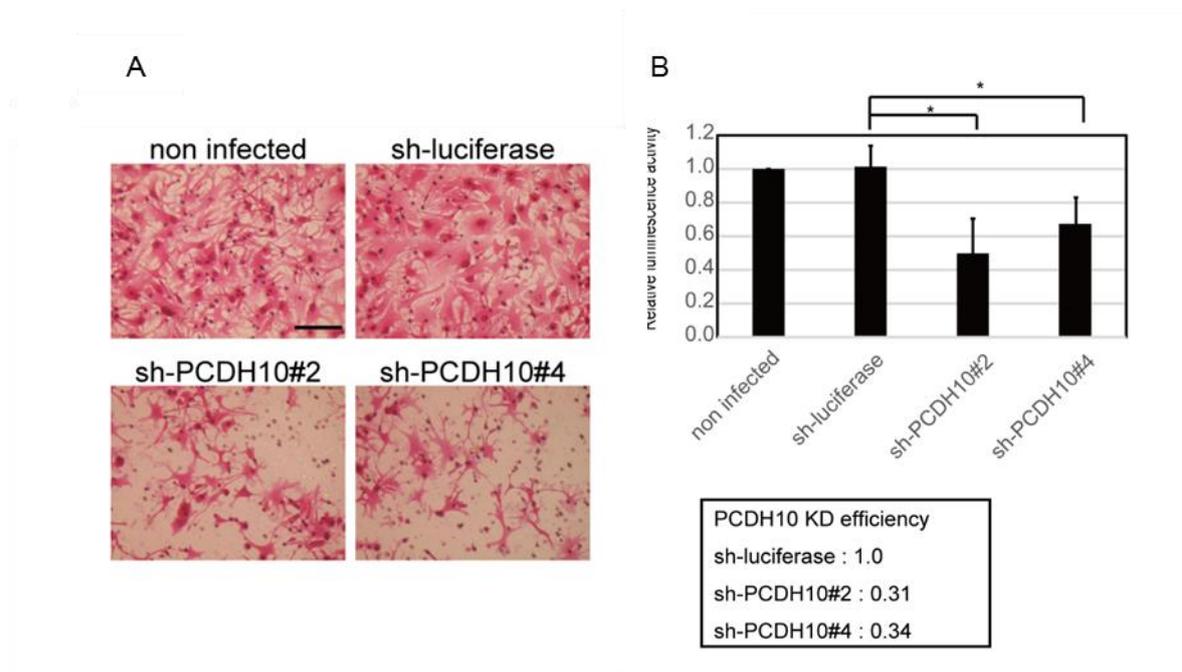


図 7. PCDH10 ノックダウンによって GB2 細胞の浸潤能が低下する。

(A, B) マトリゲルコートしたボイデンチャンバーを用いたインベーションアッセイの結果。各 shRNA を発現させた GB2 細胞を上層にまき、24 時間下層に向けて浸潤させた。上層には無血清培地を、下層には 10%FBS 添加培地を用いた。(A) ボイデンチャンバー下層部に浸潤した細胞の HE 染色画像。スケールバー：100 μ m (B) ボイデンチャンバー下層部に浸潤した細胞数を Cell Titer Glo アッセイにて測定した結果。

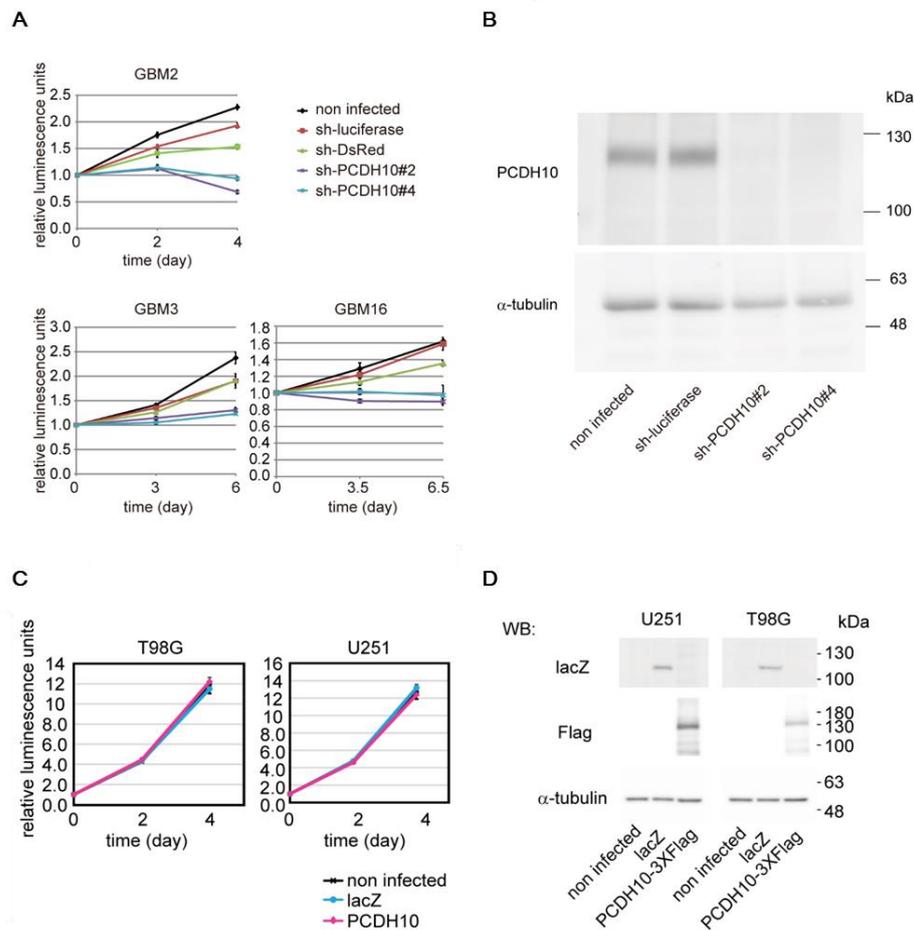


図 8. PCDH10 ノックダウンによって膠芽腫検体由来細胞株の増殖能が低下する

(A) GB2, 3, 16 細胞に各 shRNA を発現させ、Cell Titer Glo アッセイを行った結果。ウイルス感染後 3 日にまき直しを行い、図に示した日数の後、細胞数を測定した。(B) GB2 細胞に各 shRNA 発現させた 3 日後のセルライセートを用いてウエスタンブロットを行った結果。表示の各抗体を用いた。(C) T98G 細胞、U251 細胞にレンチウイルスを用いて各タンパク質を強制発現し、Cell Titer Glo アッセイを行った結果。ウイルス感染後 3 日にまき直しを行い、図に示した日数の後、細胞数を測定した。(D) ウイルス感染後 3 日目のセルライセートを用いてウエスタンブロットを行った結果。

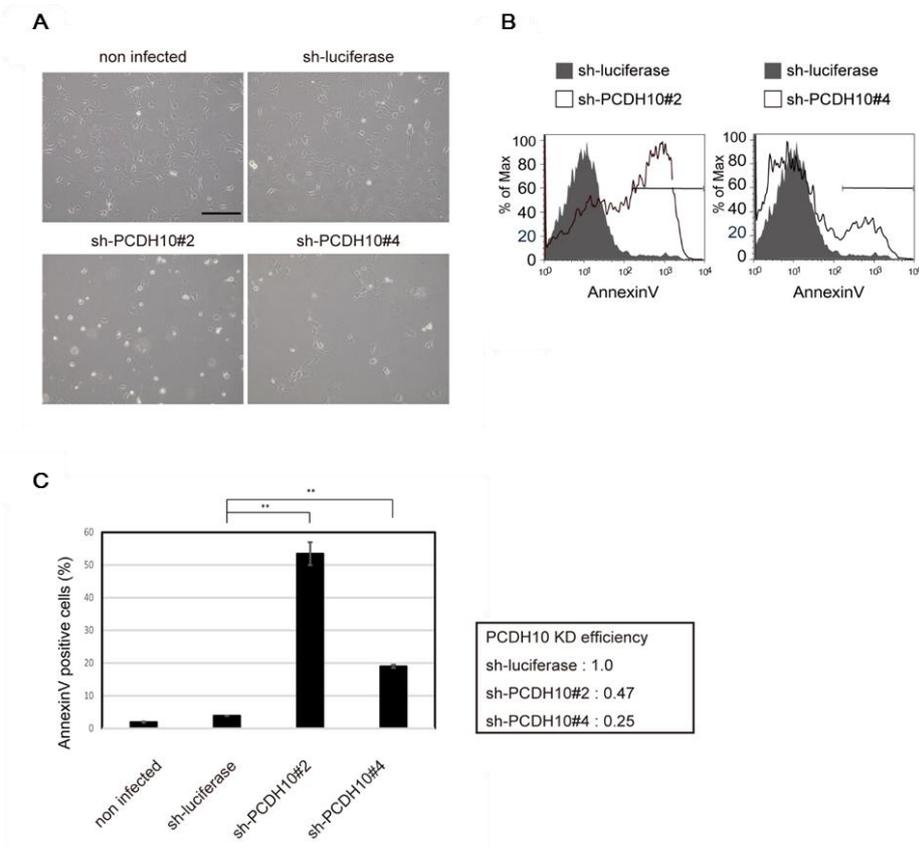


図 9. PCDH10 ノックダウンによってアポトーシスが誘導される

(A-C) GB2 細胞に各 shRNA を発現させ、AnnexinV アッセイを行った結果。(B) 各 shRNA 発現させた GB2 細胞の感染後 8 日目の明視野写真。(B) FACS により AnnexinV 陽性画分に属する細胞の割合の解析を行った結果。各サンプル代表的な 1well の解析結果を示した。(C) 解析を行った細胞のうち AnnexinV 陽性画分に含まれたの割合。3well の平均値 \pm SD。

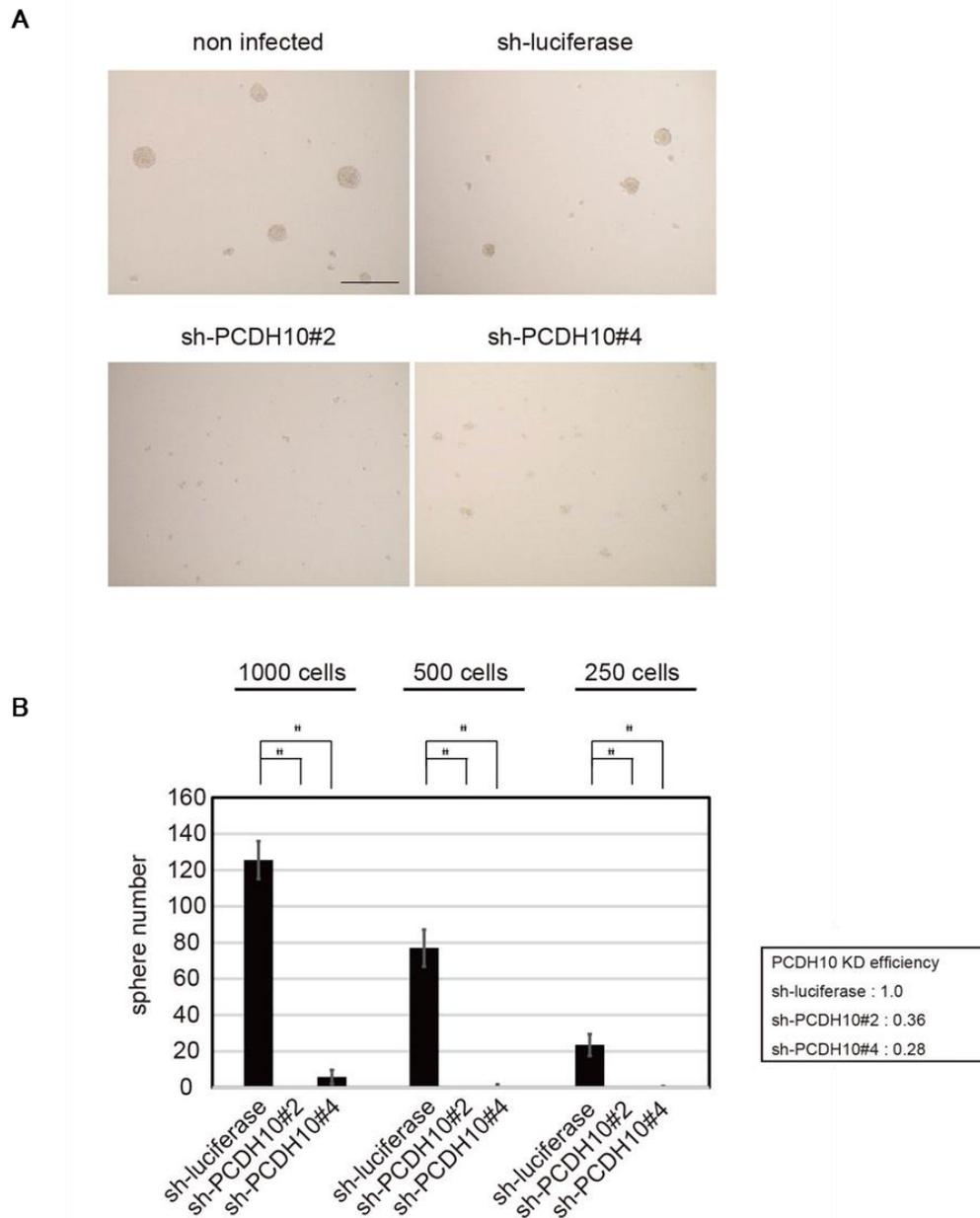


図 10. PCDH10 ノックダウンによって GB2 細胞の自己複製能が低下する。

(A, B) sphere formation assay の結果。(A) 各 shRNA を発現した GB2 細胞が形成した sphere の明視野写真。スケールバー : 200 μ m。(B) 各 shRNA を発現させた GB2 細胞を表示細胞数でまきなおした際に形成された sphere の個数をカウントした。in cell analyzer によって、96well dish の 1well 内に含まれる全ての sphere をカウントした。(A, B) グラフは 6 ウェルの平均 \pm S.D.。感染後 17 日目の結果を示した。

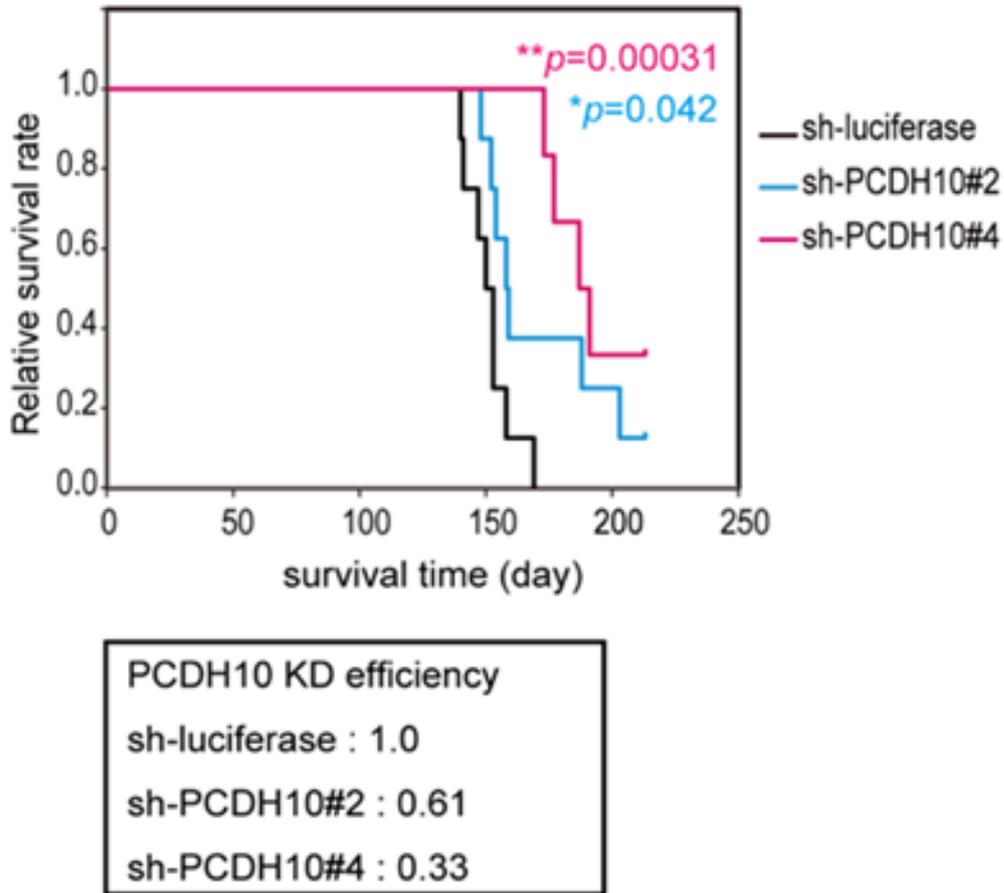


図 11. PCDH10 ノックダウンによって GB16 細胞の腫瘍形成能が低下する。

(A) 各 shRNA を発現させた GB16 細胞を 1.0×10^4 個ヌードマウス頭蓋内に同所移植し、移植後の生存日数を示した Kaplan-Meier 曲線。ログランク解析を用いて優位差検定を行った。(sh-luciferase と shPCDH10#2 n = 8、shPCDH10#4 n = 6)

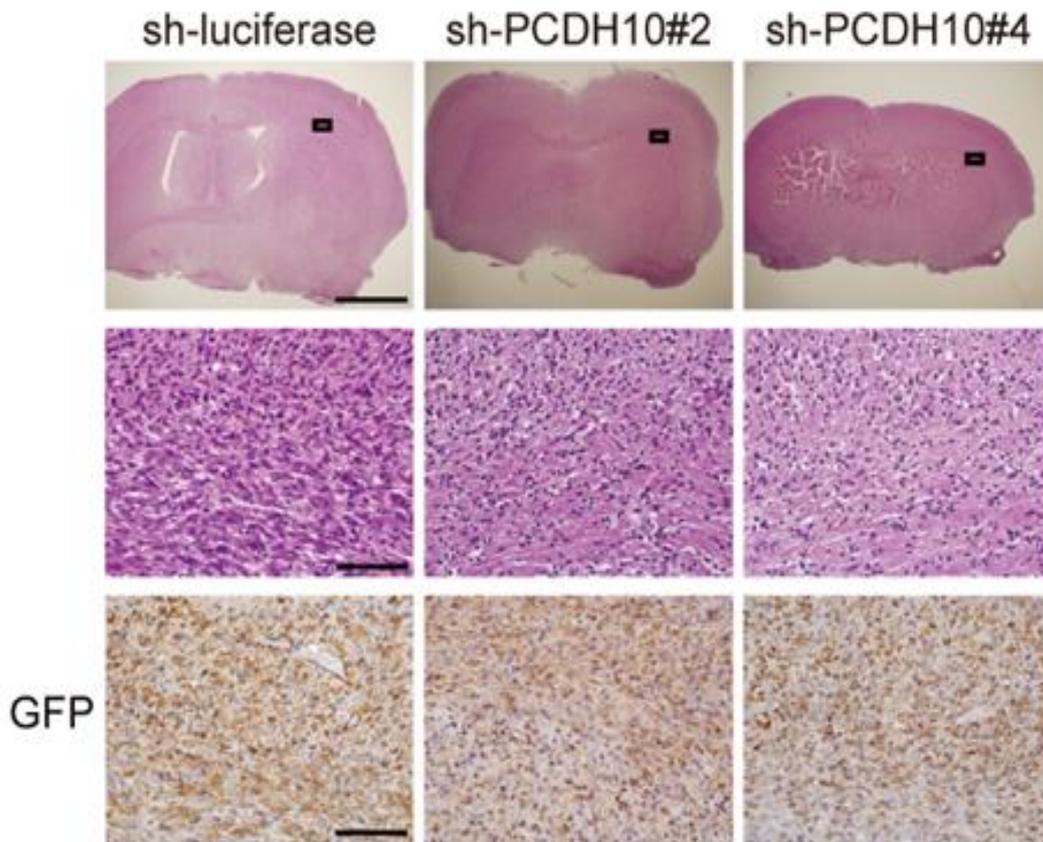


図 12. 移植した検体由来膠芽腫細胞によってマウスの脳内に浸潤性の腫瘍が形成される

GB16 細胞を移植したマウスの死後、取り出した脳から作製したパラフィン切片の染色像。移植部位付近の冠状断の HE 染色（上段、中段）、及び抗 GFP 抗体を用いた DAB 染色（下段）。上段の像に示した枠内（右半球の脳梁付近）の拡大写真を中段、下段に示した。移植した細胞は GFP を発現するため、抗 GFP 抗体を用いた DAB 染色によって 移植した腫瘍細胞の広がりを示した。切片厚 $4\mu\text{m}$ 。スケールバー：上段 2.0mm 、中段、下段 $100\mu\text{m}$ 。

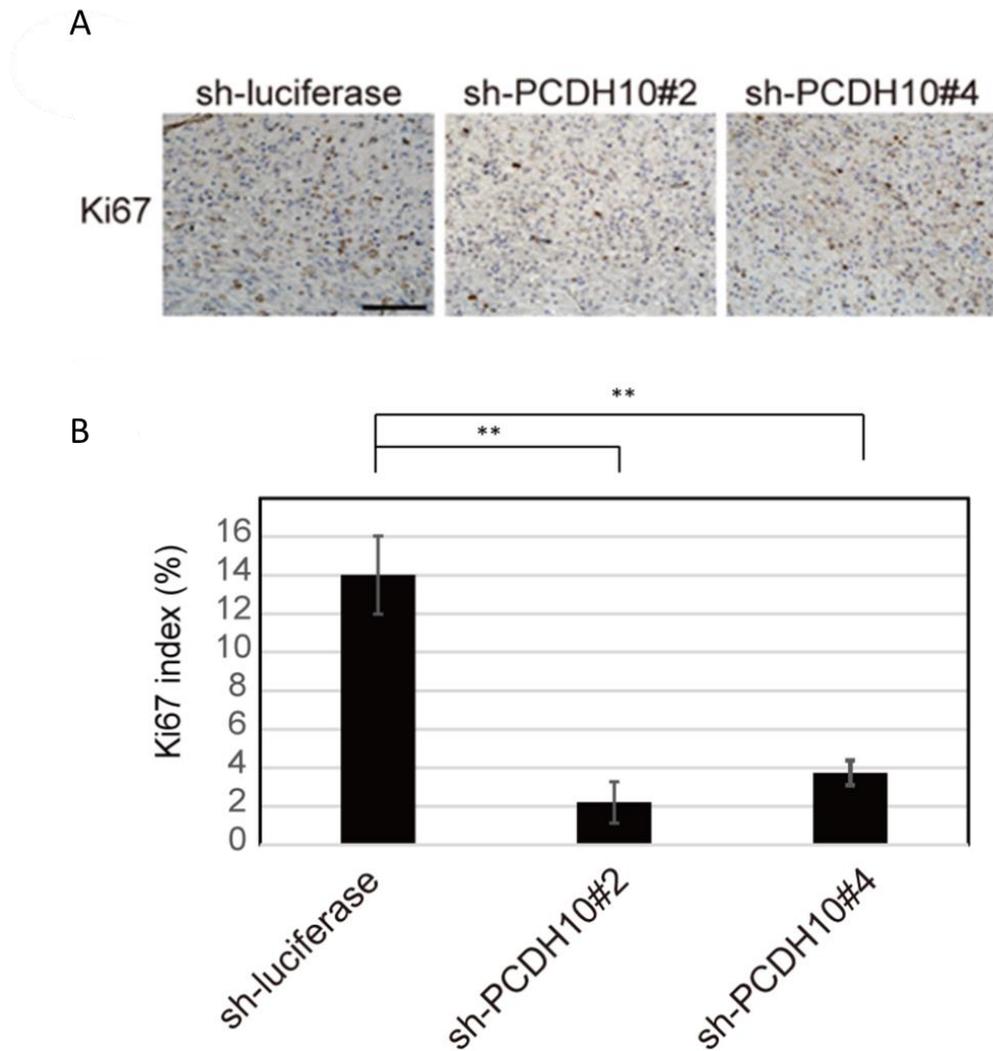


図 13. PCDH10 ノックダウンによってマウスの脳内での腫瘍細胞の増殖が抑制される

(A) マウスの死後取り出した脳から作製したパラフィン切片の染色像。GB16 細胞を移植した右半球の脳梁付近の拡大写真。マウス脳内での細胞増殖を確認するため、抗 Ki67 抗体を用いて DAB 染色を行い、増殖期にある細胞を染めた。ヘマトキシリンを用いて核染色を行った。スケールバー：100 μ m。(B) Ki67 陽性細胞の割合。抗 Ki67 抗体を用いた DAB 染色を行ったサンプルから各 6 視野ずつ、ヘマトキシリンで核が染まった 1000 個の細胞をカウントし、そのうち Ki67 陽性であった細胞の割合を示した。6 視野の平均 \pm SD を示した。

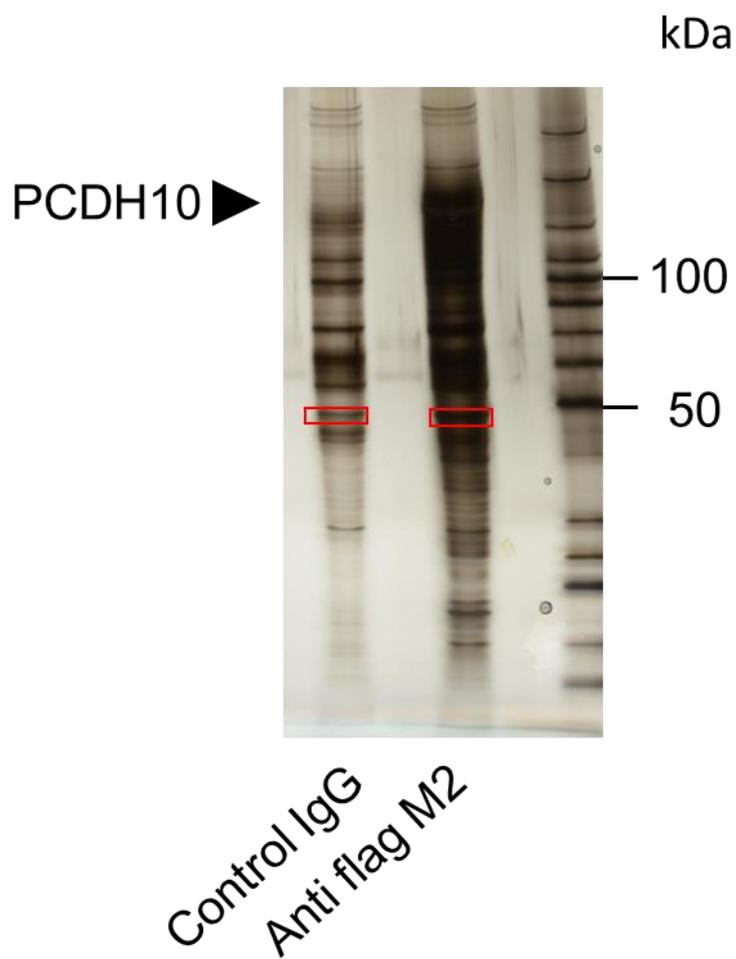


図 14. 質量分析解析を行ったサンプル

293FT 細胞に Flag タグ標識をした PCDH10 を強制発現して、Flag タグ抗体を用いて免疫沈降したサンプルを SDS ページにて電気泳動し、銀染色を行った。MEK7 に含まれるペプチド配列を検出した領域を右レーンの赤枠で示した。左レーン赤枠部分をコントロールサンプルとして切り出した。

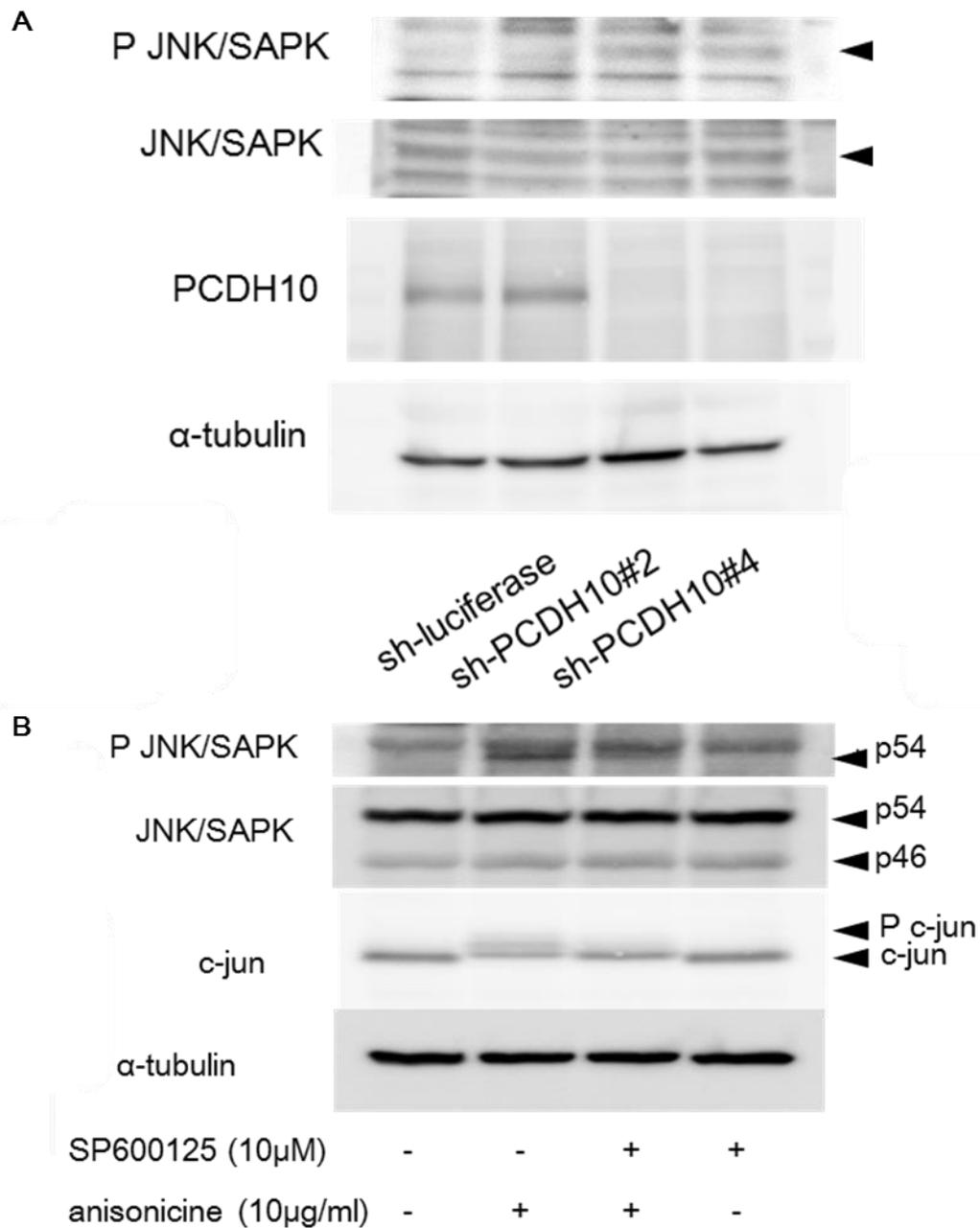


図 15. PCDH10 ノックダウンによって JNK のリン酸化が亢進する

(A) GB2 細胞に各 shRNA を強制発現し、5 日後にライセートを回収して各抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。JNK の 2 つのバンドのうち p54 のバンドを矢頭で示した。
 (B) GB2 細胞に JNK の活性化剤 anisomycin もしくは JNK の阻害剤 SP600125 を添加しウエスタンブロットを行った結果。各薬剤を添加 7 時間後に cell lysate を回収した。コントロールは DMSO を用いた。

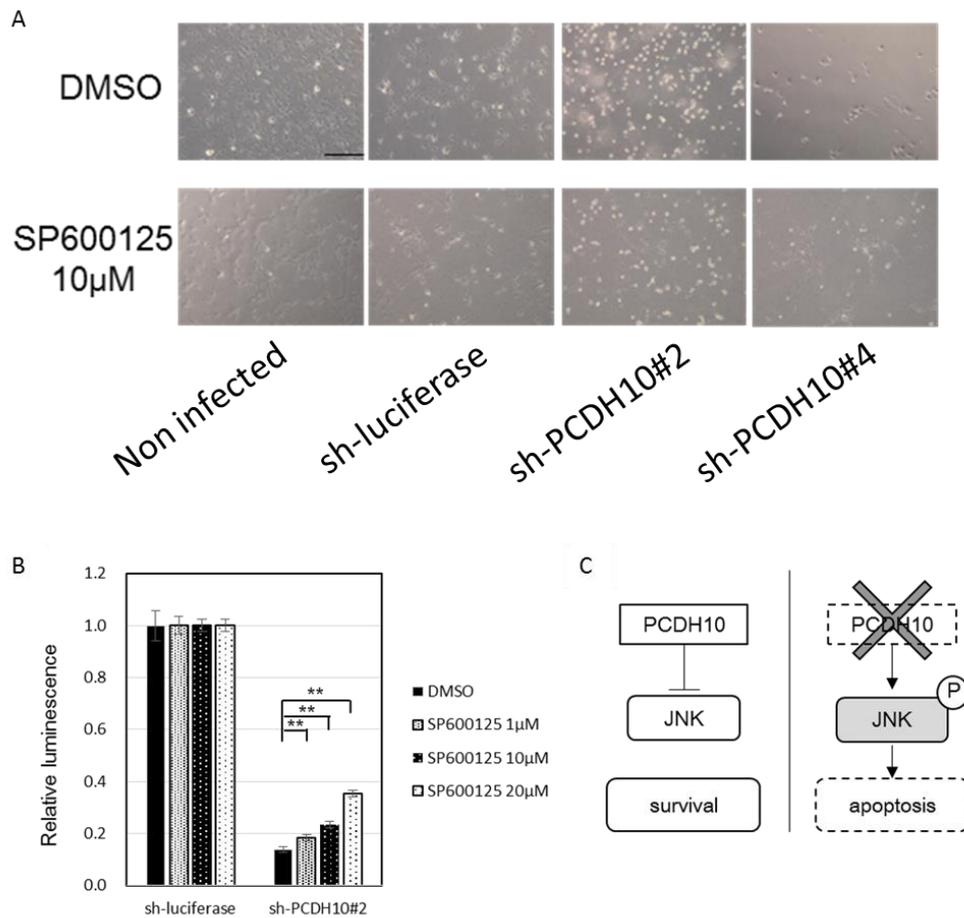


図 16. JNK 阻害剤によって PCDH10 ノックダウンによる増殖抑制が一部レスキューされる

(A) GB2 細胞に shRNA 発現ウイルス感染後 8 日目、薬剤添加後 5 日目の各細胞の明視野像。スケールバー：200 μ m。上段はコントロールとして DMSO を添加した細胞、下段は JNK の阻害剤である SP600125 を 10 μ M 添加したサンプル。(B) shRNA 発現ウイルス感染後 7.5 日目、薬剤添加 4.5 日目の細胞を用いて Cell titer glo アッセイを行った結果。sh-luciferase 感染細胞と比較した相対値。(C) PCDH10 ノックダウンからアポトーシスが起こるまでの仮説の模式図。

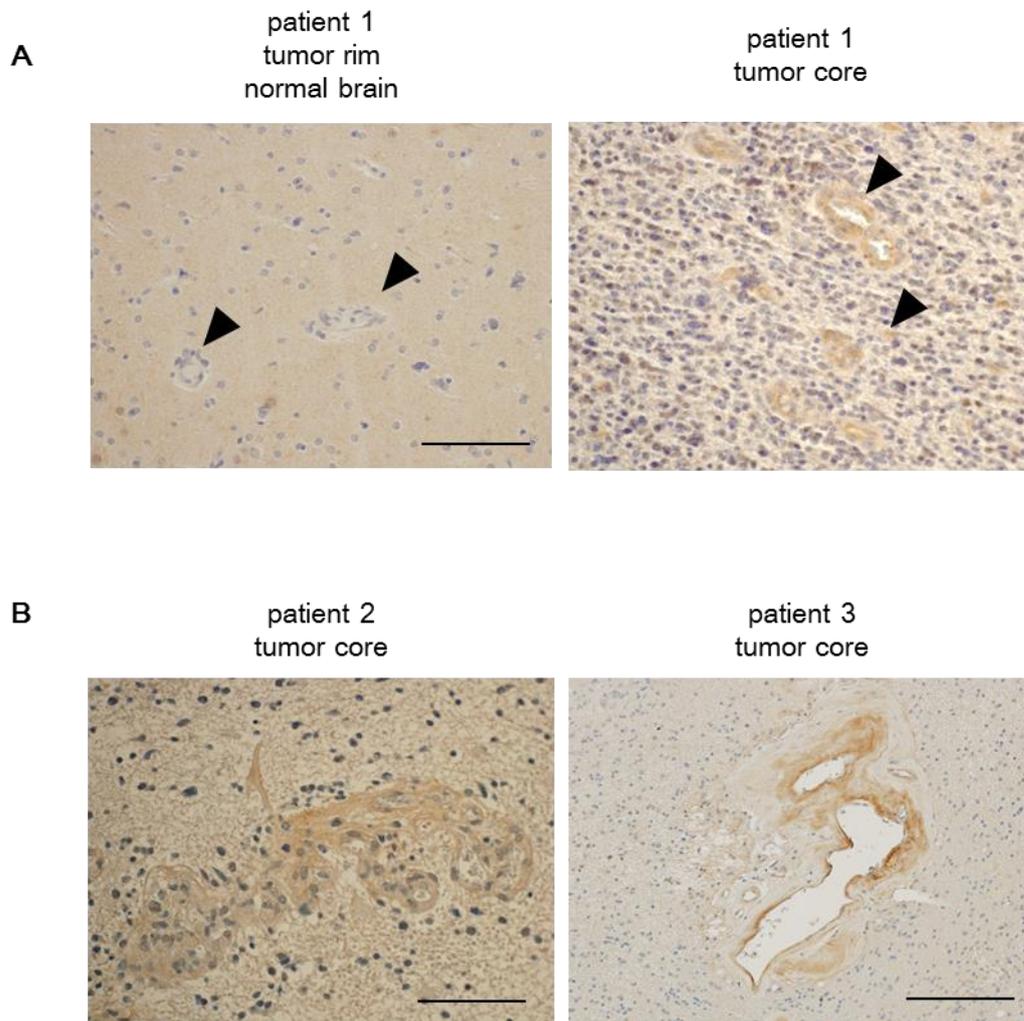
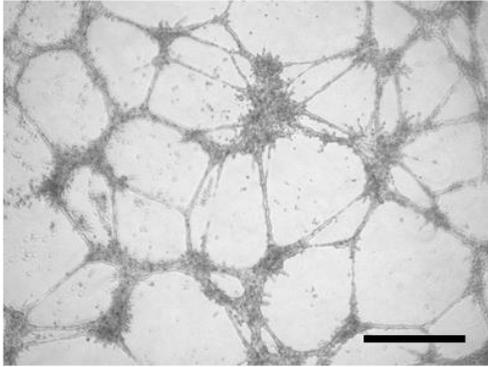


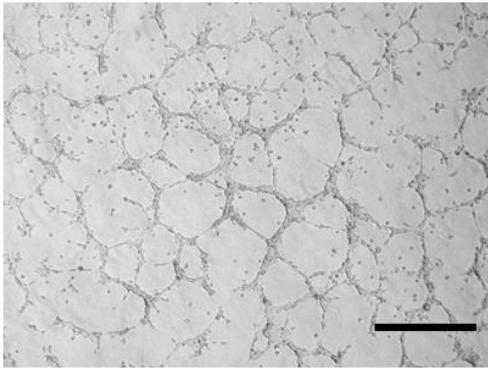
図 17. PCDH10 は正常血管内皮と比較して膠芽腫腫瘍血管内皮特異的に発現している

(A, B) 膠芽腫検体組織切片の PCDH10 抗体を用いた DAB 染色像。ヘマトキシリンを用いて核染色を行った。スケールバー: $50\mu\text{m}$ 。(A) 同一検体における正常血管と腫瘍血管の比較。矢頭で示した血管内皮細胞のうち、腫瘍組織内に存在する血管内非細胞でのみ PCDH10 が高発現を示した。(B) 膠芽腫検体 2 例における腫瘍中心部位の切片写真。腫瘍血管を中心とした部位の拡大像。スケールバー: 左図 $50\mu\text{m}$ 、右図 $100\mu\text{m}$ 。

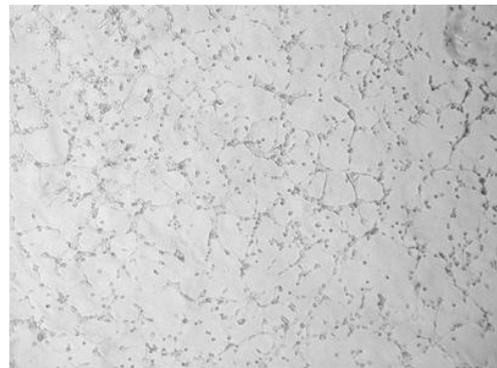
A



B



empty



sh-PCDH10#2

図 18. PCDH10 ノックダウンによって GB2 細胞のチューブフォーメーション能が低下する

(A) マトリゲル上に脳血管内皮細胞株、BMVEC 細胞をまきチューブフォーメーションアッセイを行った際の明視野画像。細胞をまいてから 24 時間後に観察を行った。(B) マトリゲル上 GB2 細胞をまきチューブフォーメーションアッセイを行った際の明視野画像。各 shRNA を強制発現し 3 日後にまき直した。細胞をまきなおしてから 24 時間後に観察を行った。スケールバー：500 μ m

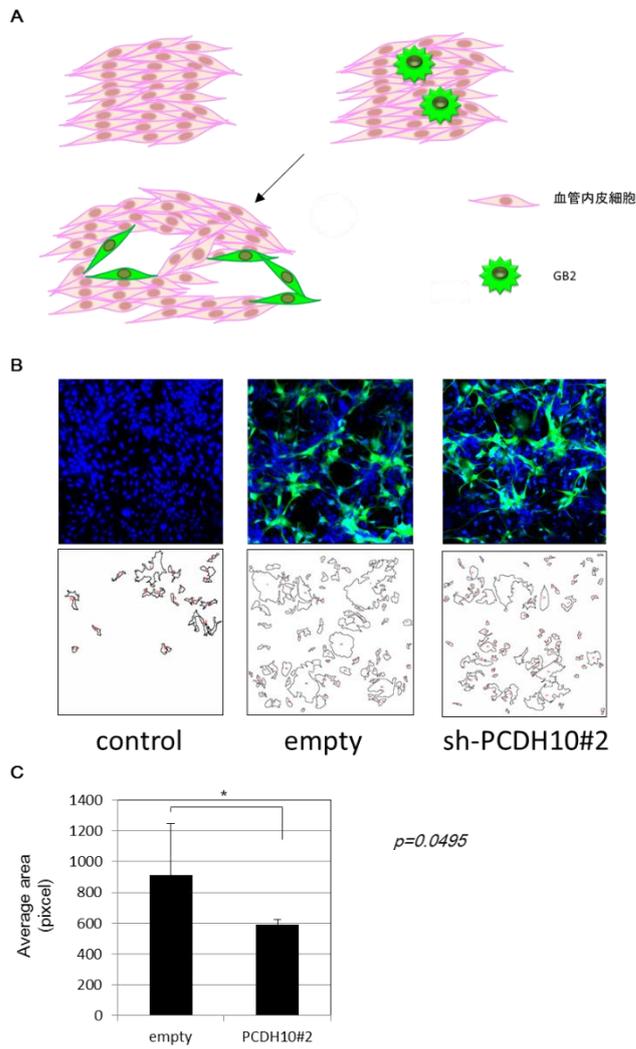


図 19. PCDH10 ノックダウンによって血管内皮細胞シートへの形態変化誘導能力が低下する。

(A) 血管内皮細胞と GB2 細胞の個カルチャー実験の概要。一層にコンフルエントにした BMVEC 細胞上に GFP で蛍光標識した GB2 細胞をまき、24 時間後に形態の変化を観察した。(B) 蛍光顕微鏡による観察像。各サンプルの代表的な 1 視野を示した。核染は TOPRO3 (上段)。Control は BMVEC 細胞シートのみ。(下段) imageJ による画像解析の結果、細胞がないエリアとして認識された部分。(C) 1 視野あたりに存在する細胞がないエリアの面積の平均値。各サンプル 3 視野の平均 \pm SD を示す。

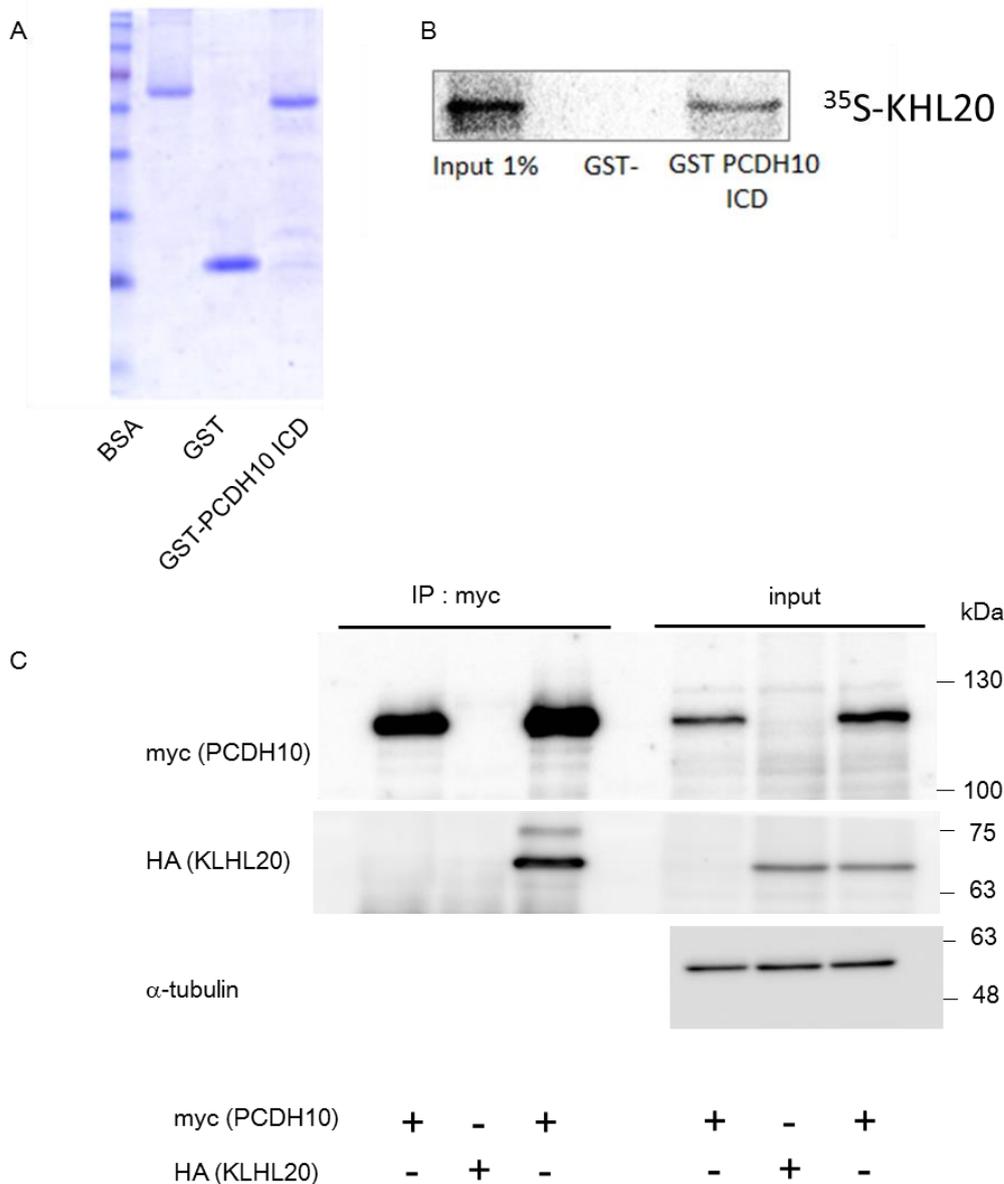


図 20. KLHL20 は PCDH10 と結合する

(A, B) GST プルダウンアッセイの結果。(A) 大腸菌で合成した GST タンパク質及び PCDH10 細胞内ドメインの GST タンパク質の CBB 染色。各サンプル 2 μ g ずつアプライした。(B) in vitro translation によって合成した ³⁵S 標識 KLHL20 と PCDH10 細胞内ドメインの GST 融合タンパク質を用いてプルダウンアッセイを行って、沈降された KLHL20 のバンドを示した。(C) 免疫沈降実験の結果。293FT 細胞にタグ標識をした PCDH10 と KLHL20 を強制発現し 24 時間後に細胞を溶解した。セルライゼート 300 μ g に抗 myc タグ抗体 2.5 μ g を用いて免疫沈降実験を行った。20 μ g のタンパク質を input として泳動した。図に示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

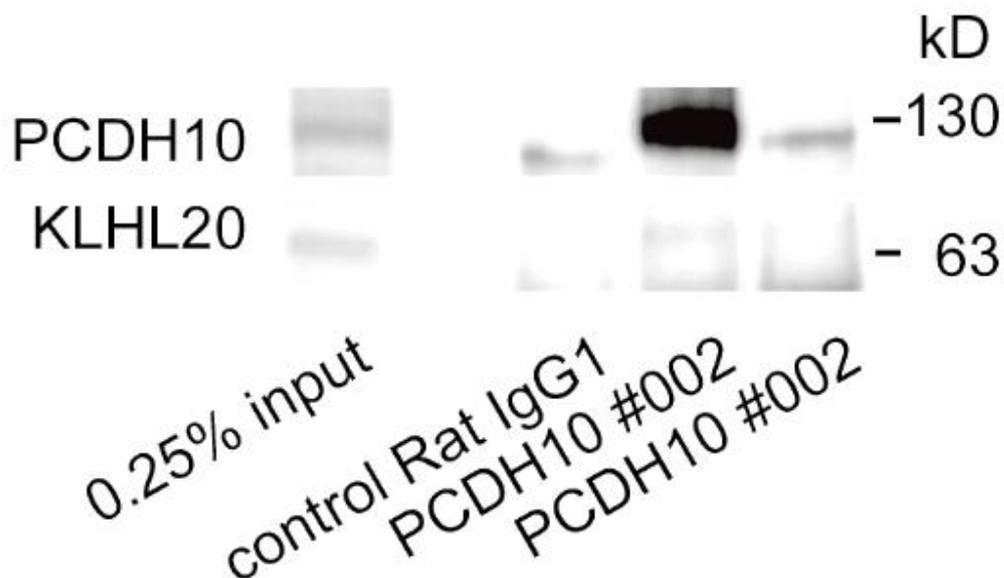
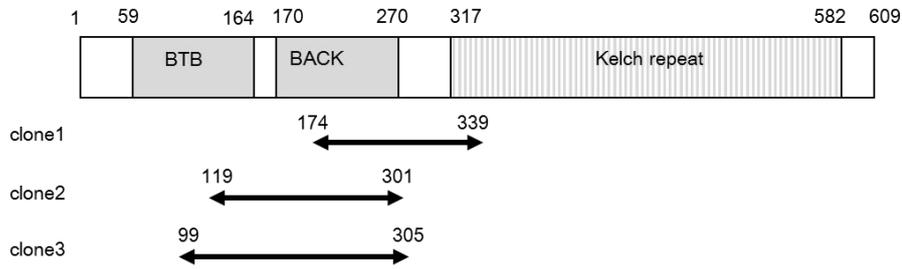


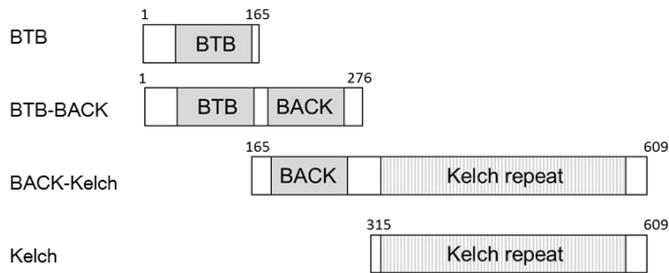
図 21. 内在性の PCDH10 と KLHL20 は結合する

PCDH10 の細胞外をエピトープとする抗 PCDH10 rat モノクローナル抗体 (PCDH10#002) を用いて免疫沈降実験を行った結果。各サンプルにつき 293FT 細胞 10cm 培養皿 1 枚分のセルライゼートを回収し、抗体 $2\mu\text{g}$ を用いて免疫沈降を行った。抗体特異的な非特異的バンドを確認するためのコントロールとして細胞溶解バッファーのみを用いて免疫沈降を行った (一番右のレーン)。図に示した抗体をもちいてウエスタンブロットを行った。

A



B



C

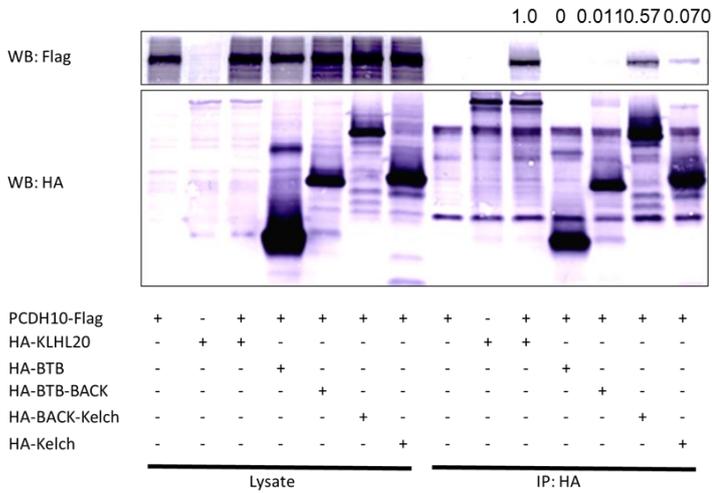


図 22. KLHL20 は BACK ドメイン及び kelch repeat ドメインを介して PCDH10 と結合する。

(A) KLHL20 タンパク質のドメインの模式図。ツーハイブリッドスクリーニングで同定した PCDH10 との結合領域を矢印で示した。(B) 作製した KLHL20 変異体の模式図。(C) 免疫沈降実験の結果。293FT 細胞に各タグ標識タンパク質発現用のベクターをコトランスフェクションして myc タグ抗体を用いて免疫沈降実験を行い、各 KLHL20 変異体と PCDH10 の結合量を定量した。全長の KLHL20 を用いた沈降実験を行った際にプルダウンされてきた PCDH10 の量との相対値を数値で示した。

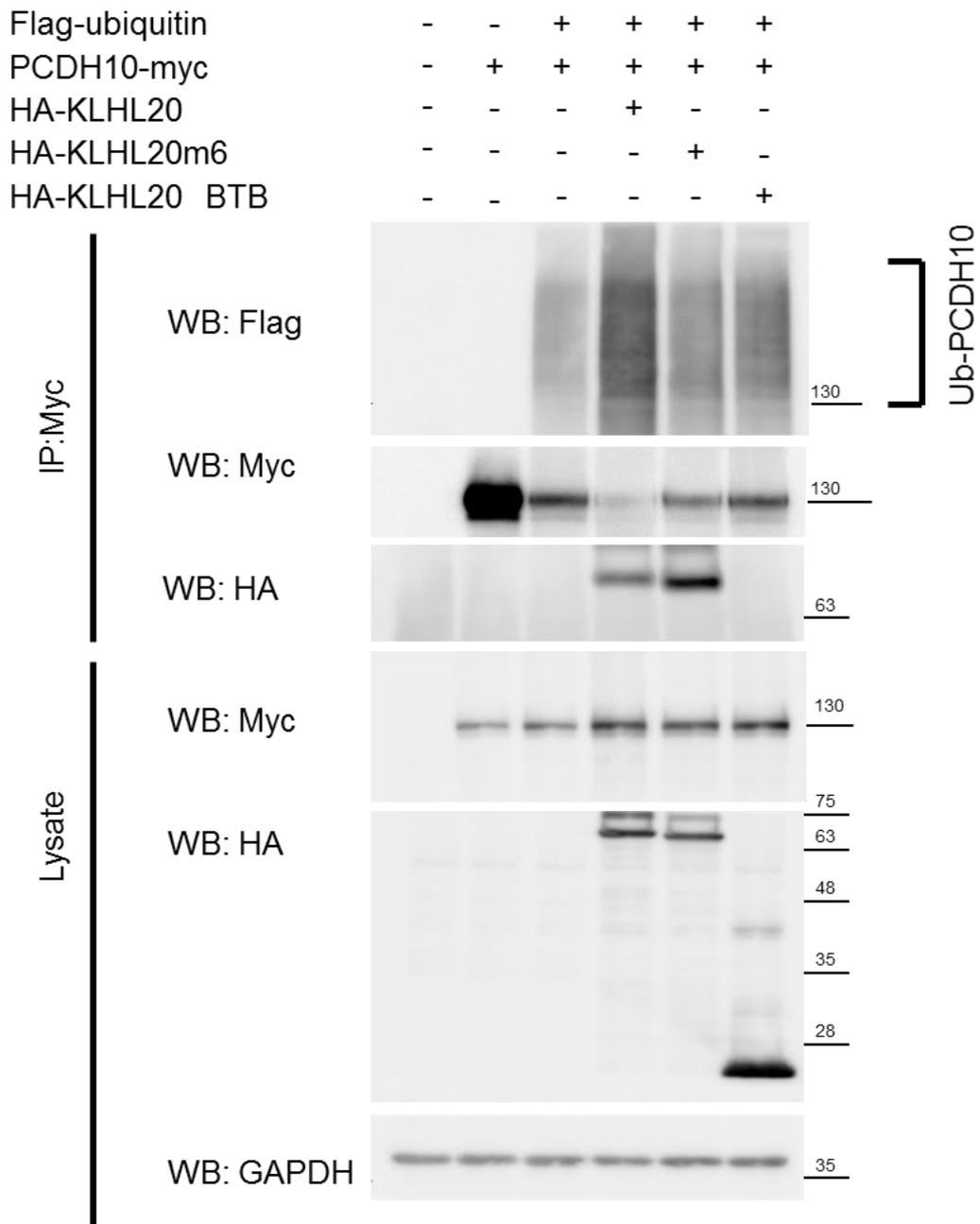


図 23. KLHL20 は PCDH10 のユビキチン化を促進する

in vivo ubiquitination assay の結果。293FT 細胞に PCDH10, ubiquitin, KLHL20 及び KLHL20 変異体を強制発現し、免疫沈降実験を行った。タンパク質ライセート 300 μ g に、抗 myc タグ抗体 2.5 μ g を用いて免疫沈降を行い各抗体をもちいてウエスタンブロットを行った。KLHL20m6: Cul3 と結合できない KLHL20 変異体。BTB: KLHL20 の BTB ドメインのみの変異体。

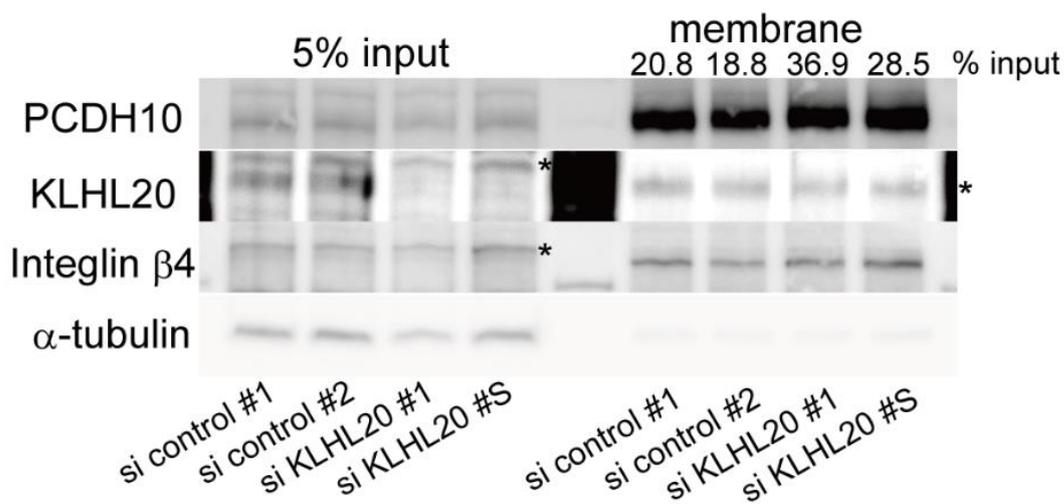


図 24. KLHL20 ノックダウンによって細胞膜上に存在する PCDH10 のタンパク質量が増加する

293FT 細胞に siRNA をトランスフェクションし、96 時間後に膜タンパク質をビオチン化してプルダウンアッセイを行った結果。図に示した抗体を用いてウエスタンブロットを行った。細胞膜画分のコントロールとして integrin-β4 を、細胞質のコントロールとして α-tubulin を用いた。非特異的なバンドを*で示した。

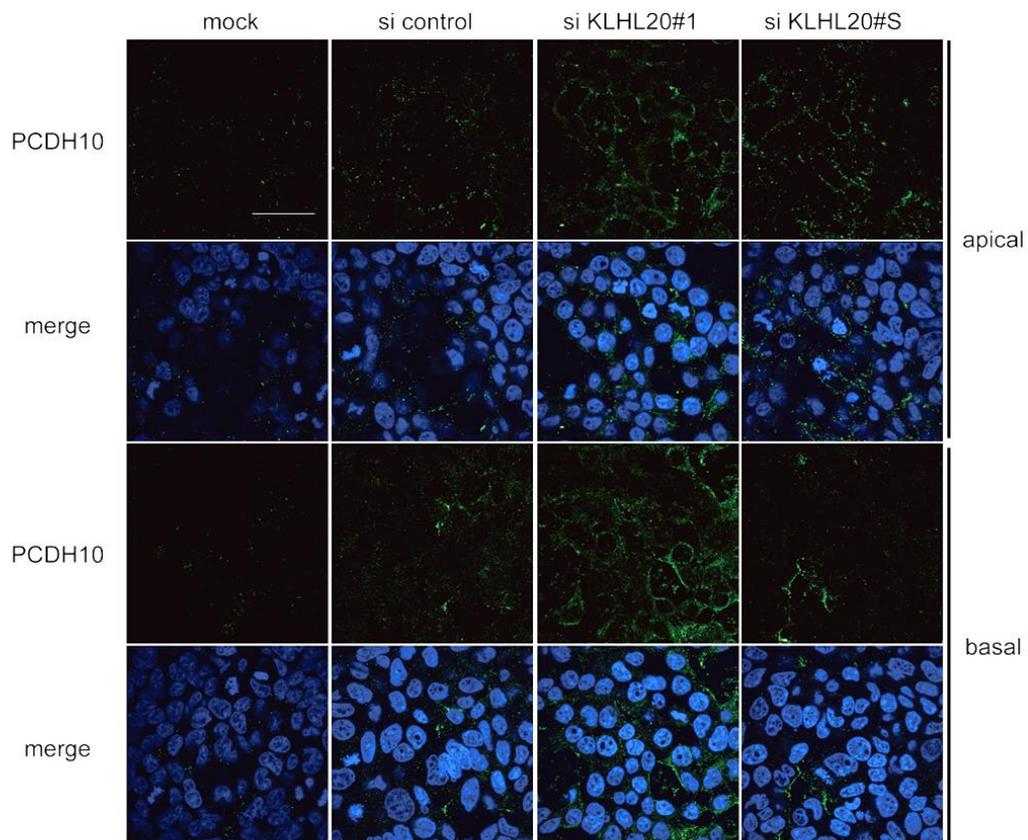


図 25. KLHL20 ノックダウンによって細胞膜上に PCDH10 が濃縮する

293FT 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、96 時間後に固定をして免疫染色を行った結果。同一視野の細胞接着面側と、細胞頂点部分側の 2 画像を示した。抗 PCDH10 抗体 (5G10) と Alexa488 anti RatIgG 抗体を用いて PCDH10 を染色した。ヘキストを用いて核染を行った。スケールバー : 40 μ m

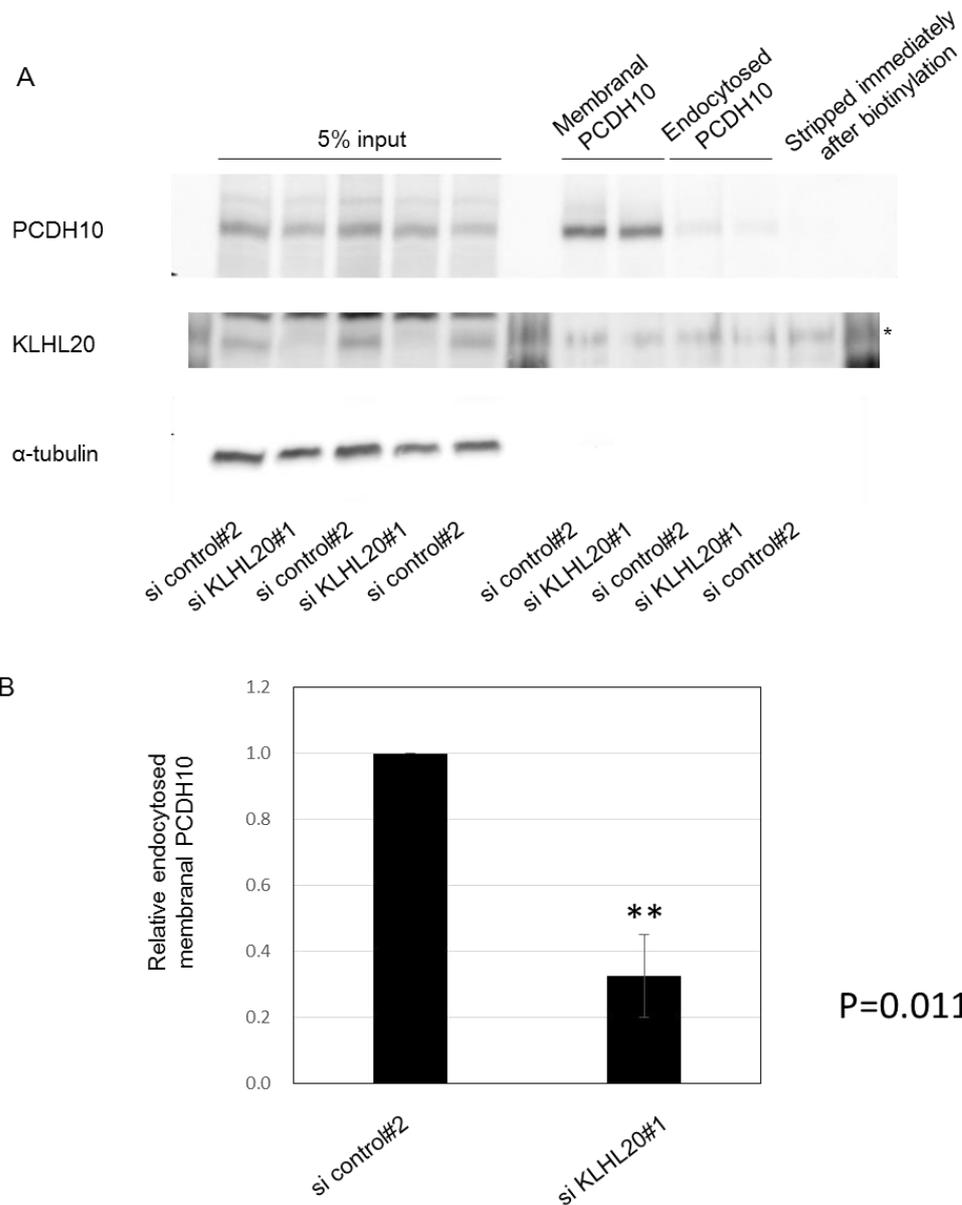


図 26. KLHL20 ノックダウンによって膜上の PCDH10 のエンドサイトーシスが抑制される

(A, B) 293FT 細胞を用いてエンドサイトーシスアッセイを行った結果。siRNA を用いて KLHL20 ノックダウンし 96 時間後にアッセイを行った。(A) ウェスタンブロットの結果。(B) ウェスタンブロットのバンドを定量化した結果。膜上に存在するタンパク質のうち、エンドサイトーシスによって取り込まれた割合を、コントロールと比較した相対値を示す。3 回分の実験の平均値。

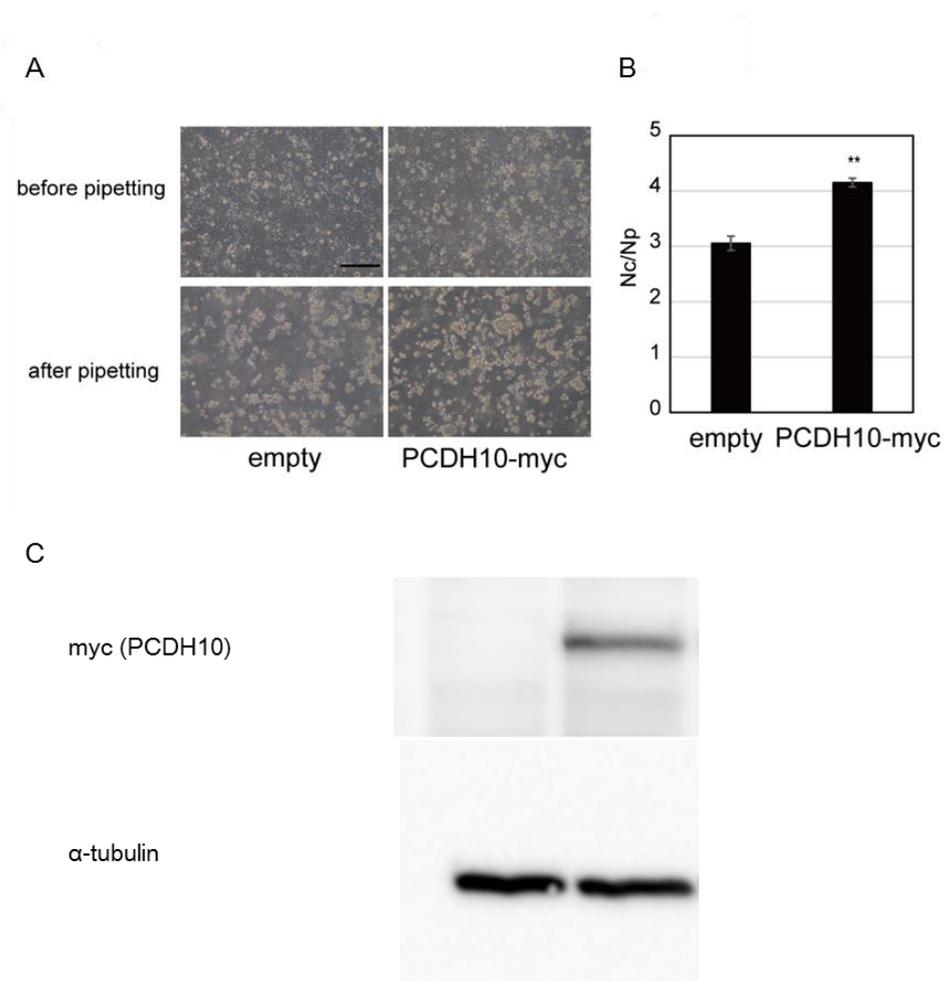


図 27. PCDH10 の強制発現によって細胞間接着が亢進する

(A-C) 293FT 細胞に myc タグ標識をした PCDH10 を強制発現し、24 時間後にクランプアッセイを行った。(A) クランプアッセイ時の細胞の明視野写真。上段はピペッティング前、下段はピペッティング後。スケールバー：200 μ m。(B) ピペッティング後のクランプ数を全細胞数で割った値 (Nc/Np)。3 ウェルの値の平均 \pm SD。(C) アッセイ時の細胞のセルライゼートを用いて行ったウエスタンブロットの結果。

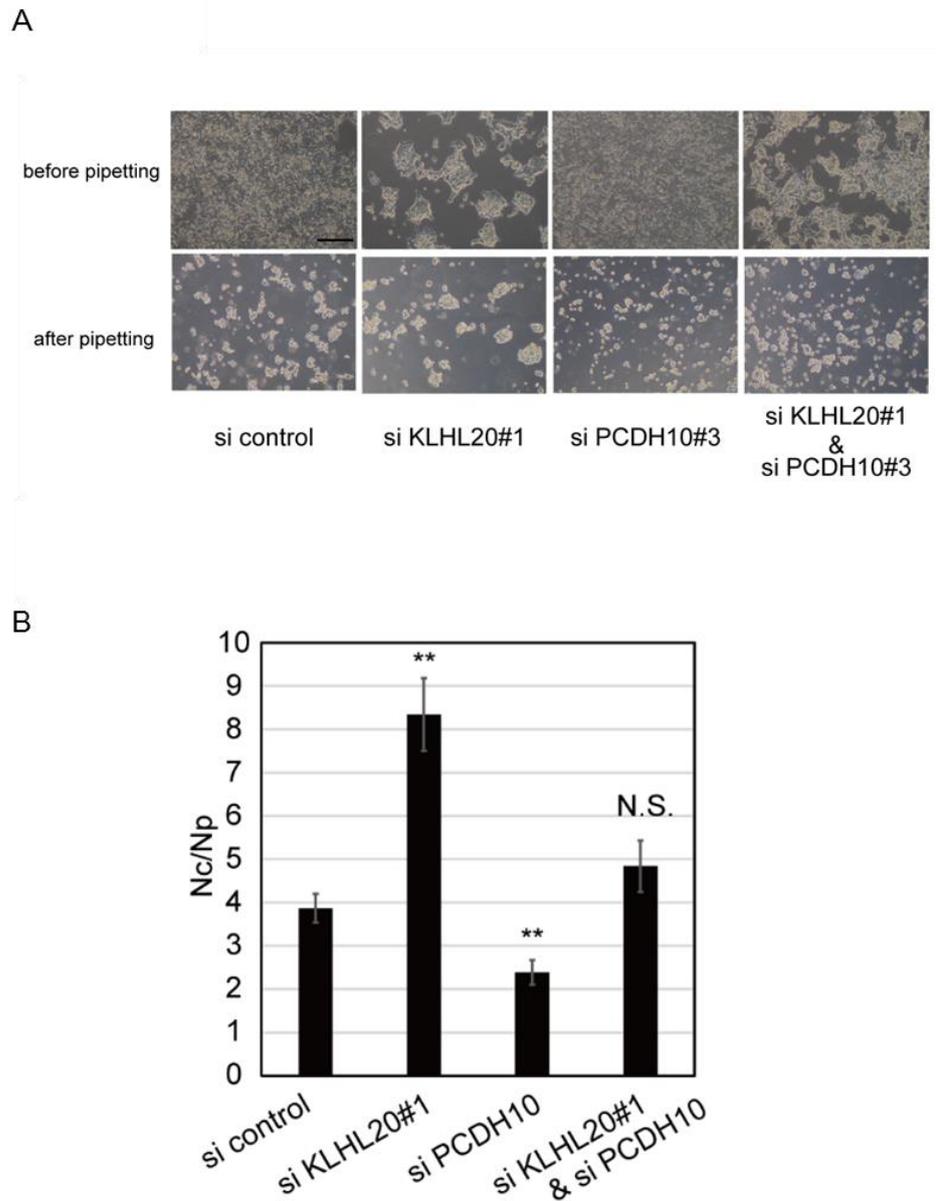


図 28. KLHL20 ノックダウンによって PCDH10 依存的に細胞間接着が亢進する

(A, B) 293FT 細胞 KLHL20, PCDH10 に対する siRNA をトランスフェクションし、クランプアッセイを行った結果。(A) siRNA トランスフェクション後、96 hr での明視野写真。上段はピペッティング前、下段はピペッティング後。スケールバー：200 μ m。(B) ピペッティング後のクランプ数を全細胞数で割った値 (Nc/Np)。3 ウェルの値の平均 \pm SD。

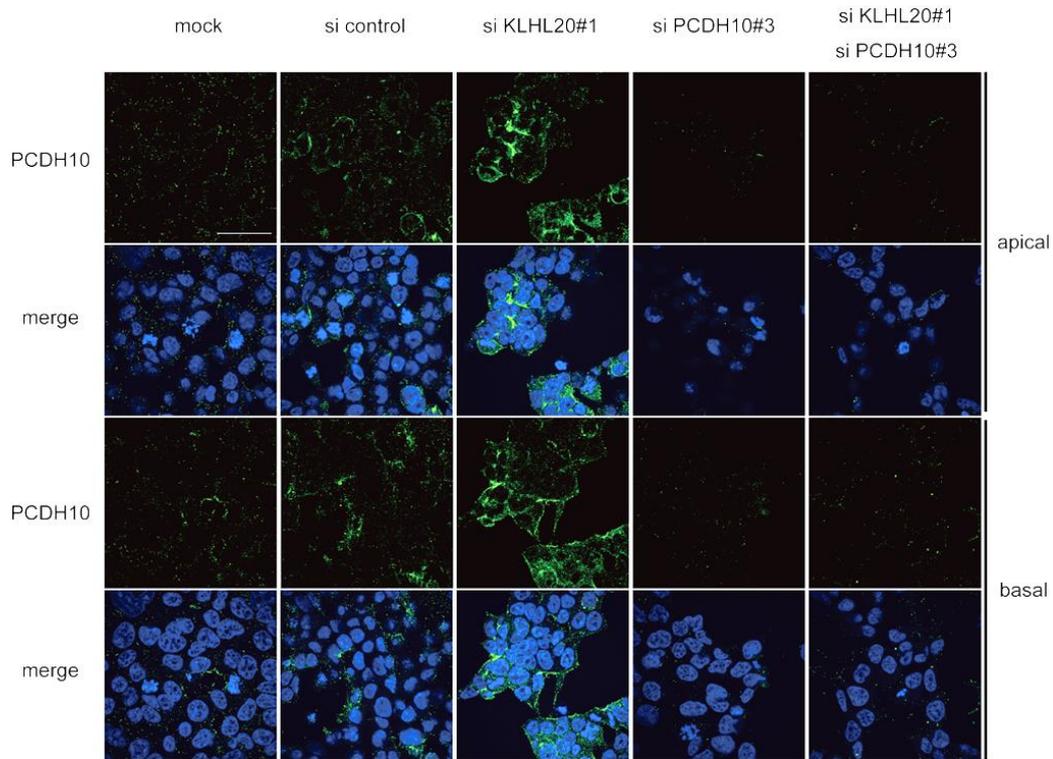


図 29. KLHL20 PCDH10 ノックダウン時の PCDH10 の局在

293FT 細胞において各遺伝子をノックダウンした際の PCDH10 の蛍光免疫染色画像。抗 PCDH 抗体 (5G10) と Alexa488 anti Rat IgG 抗体を用いて染色を行った。siRNA トランスフェクション 96 時間後にサンプルを固定し、染色を行った。スケールバー: 40 μ M。

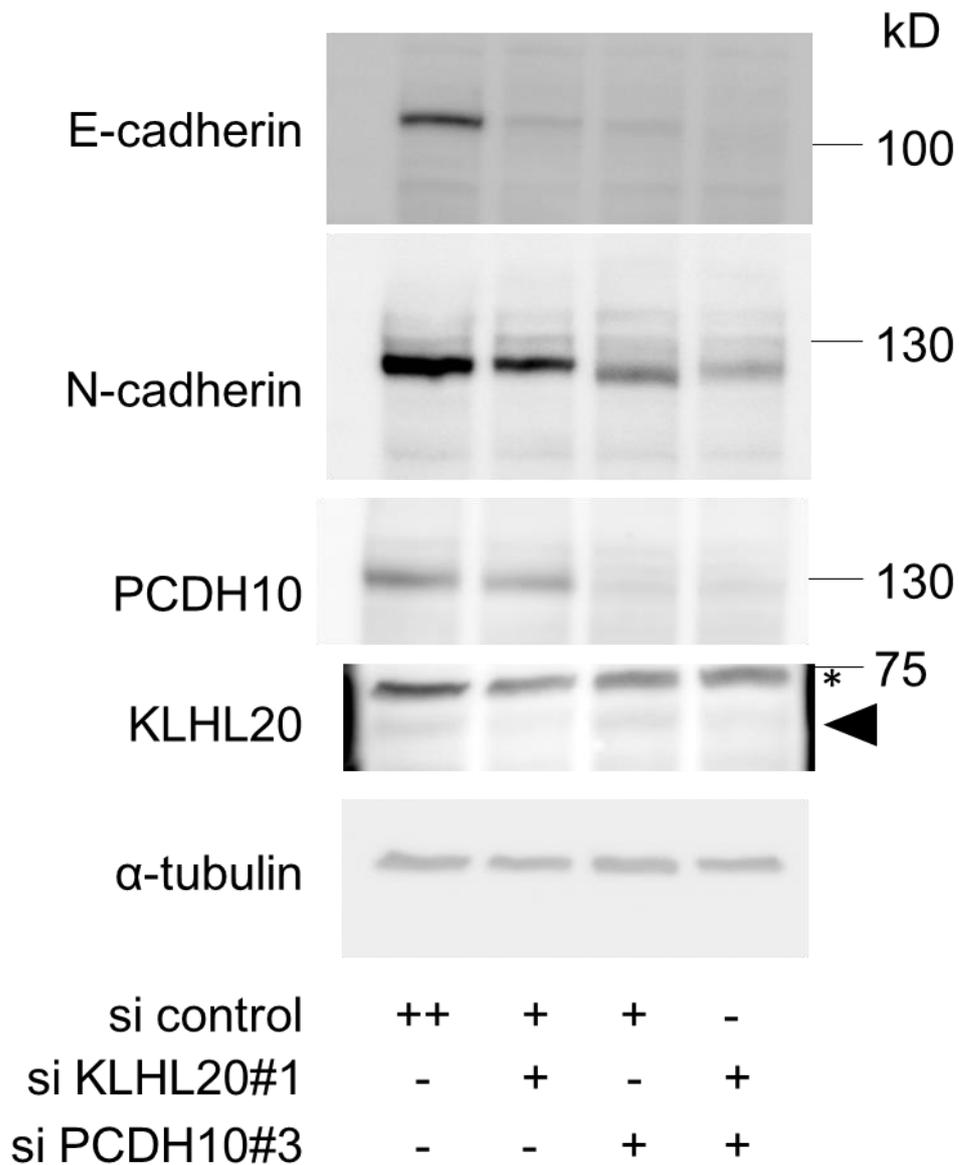


図 30. KLHL20 ノックダウンによって E-cadherin や N-cadherin のタンパク質量は増加しない

293FT 細胞において siRNA を用いて各遺伝子をノックダウンした際の各タンパク質の発現量を確認するために行ったウエスタンブロットの結果。siRNA をトランスフェクションして 96 時間後にタンパク質を回収し、20 μg を各レーンにアプライした。KLHL20 のバンドを矢頭で、非特異的なバンドを*で示した。

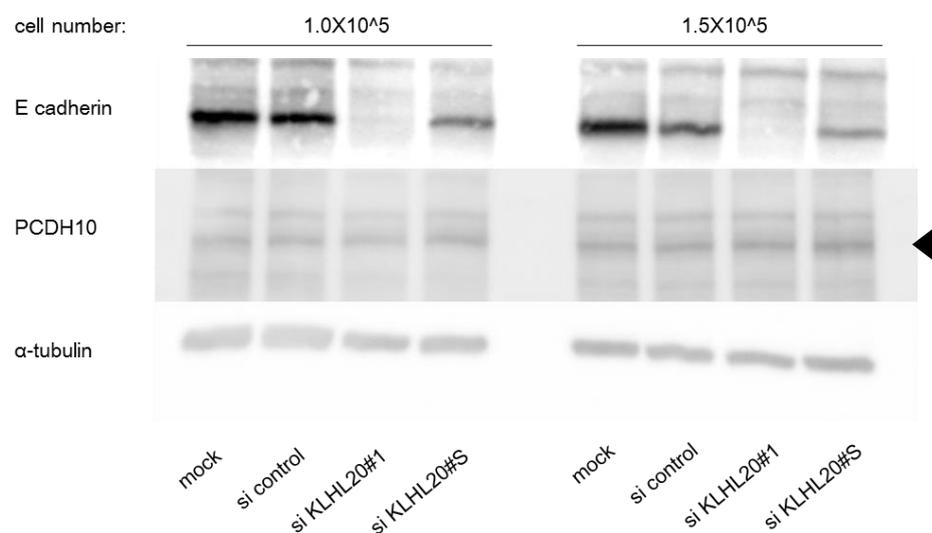


図 31. KLHL20 ノックダウンによって Ecadherin のタンパク質発現量が低下する

293FT 細胞に siRNA をトランスフェクションした後 96 時間で細胞を回収して行ったウエスタンブロッティングの結果。細胞接着面の多寡によって Ecadherin のタンパク質量が変化している可能性を排除するため、細胞数を変えて、アッセイを行った。PCDH10 のバンドを矢頭で示した。

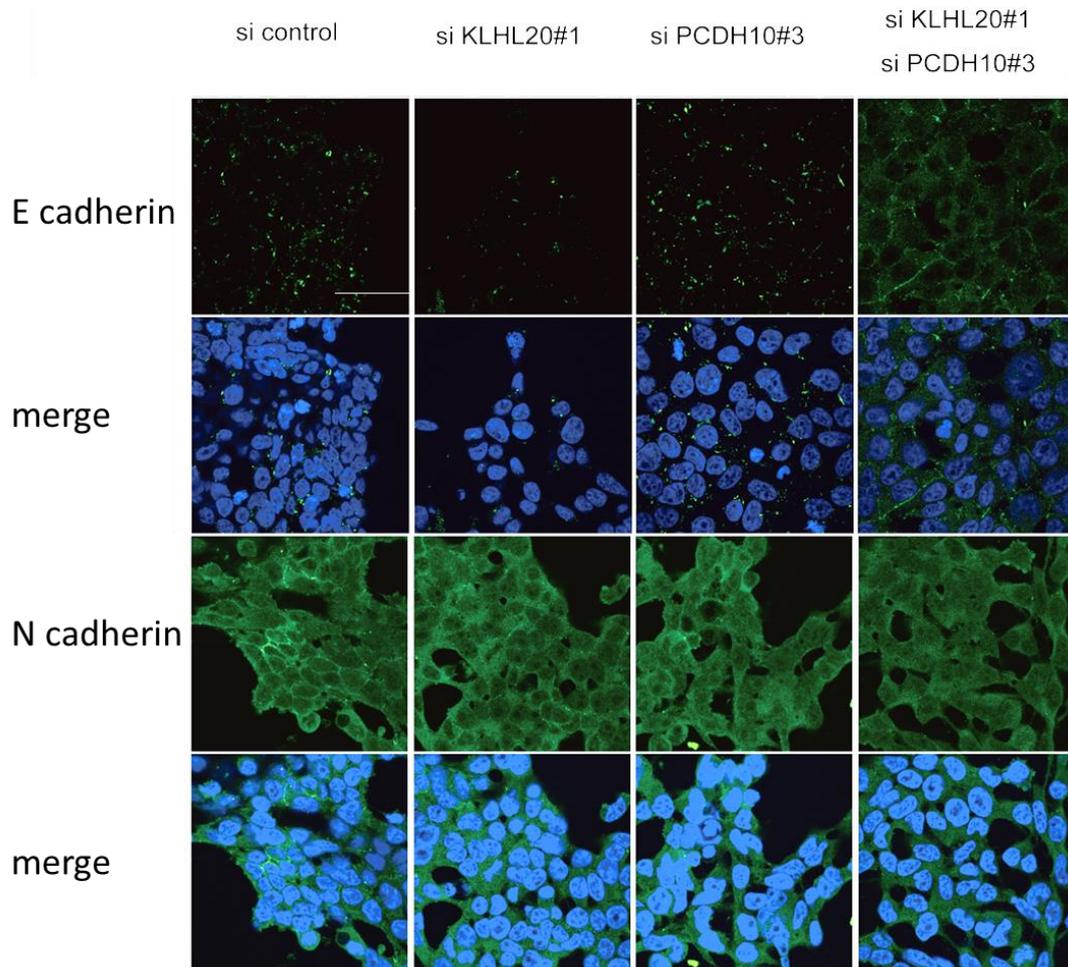


図 32. KLHL20, PCDH10 ノックダウンによって E-cadherin と N-cadherin の局在は変化しない

293FT 細胞において各遺伝子をノックダウンした細胞の蛍光免疫染色画像。E-cadherin, N-cadherin 抗体を用いて染色を行った。2 次抗体は Alexa488 anti mouse IgG を用いた。培養皿への接着面付近の画像。ヘキストを用いて核染色を行った。スケールバー: 40 μ M

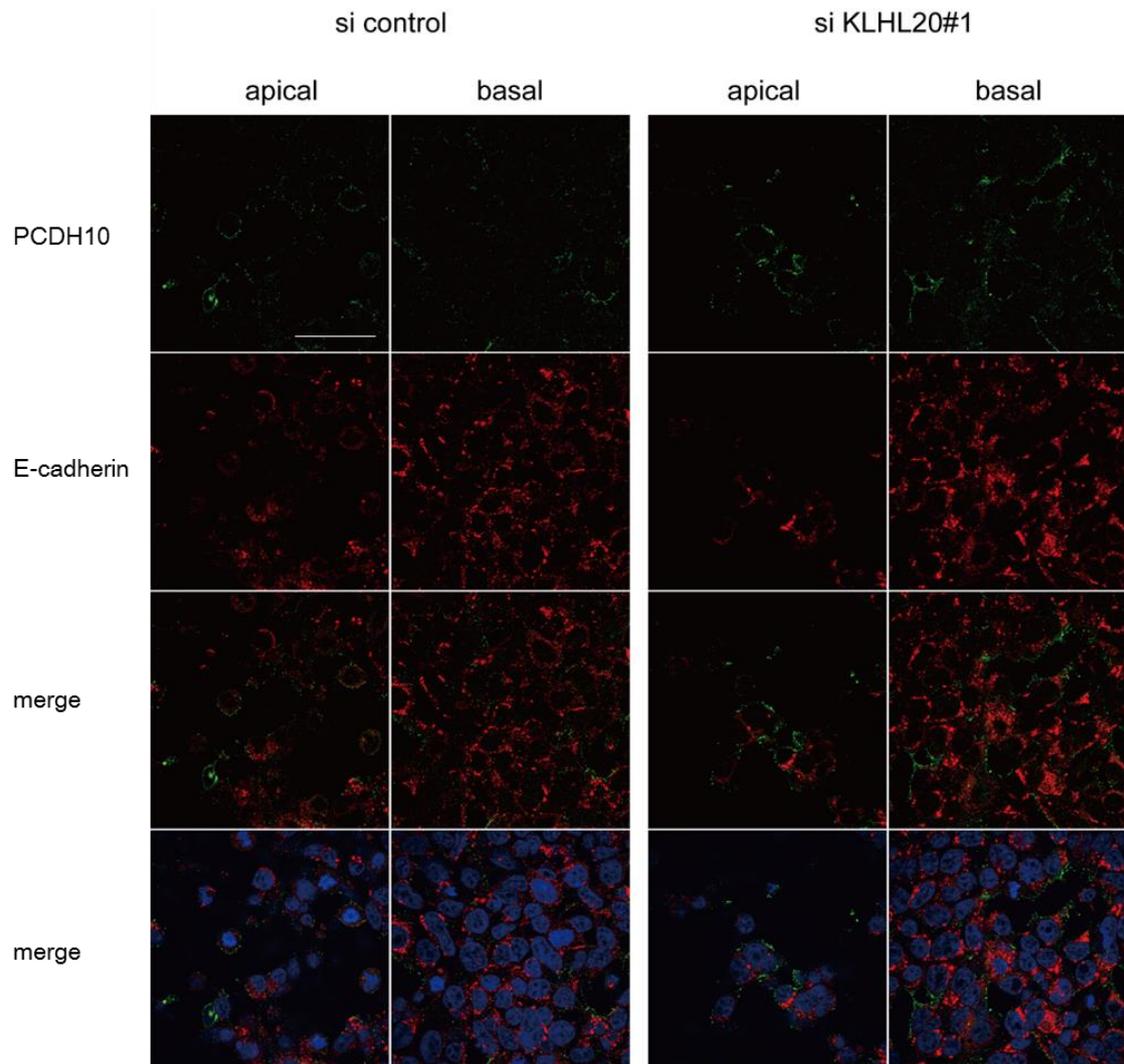


図 33. 細胞間接着部位において PCDH10 と Ecadherin は共局在しない

293FT 細胞に siRNA をトランスフェクション後 96 時間に細胞を固定し蛍光免疫染色を行った。コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞の染色像を左側に、KLHL20 に対する siRNA をトランスフェクションした細胞の染色像を右側に示した。同一視野の細胞底面側 (basal) と、細胞頂点部分側 (apical) の 2 画像を示す。PCDH10 の染色像を緑で、E-cadherin の染色像を赤で示した。ヘキストを用いて核染色を行った。スケールバー : 40 μ m

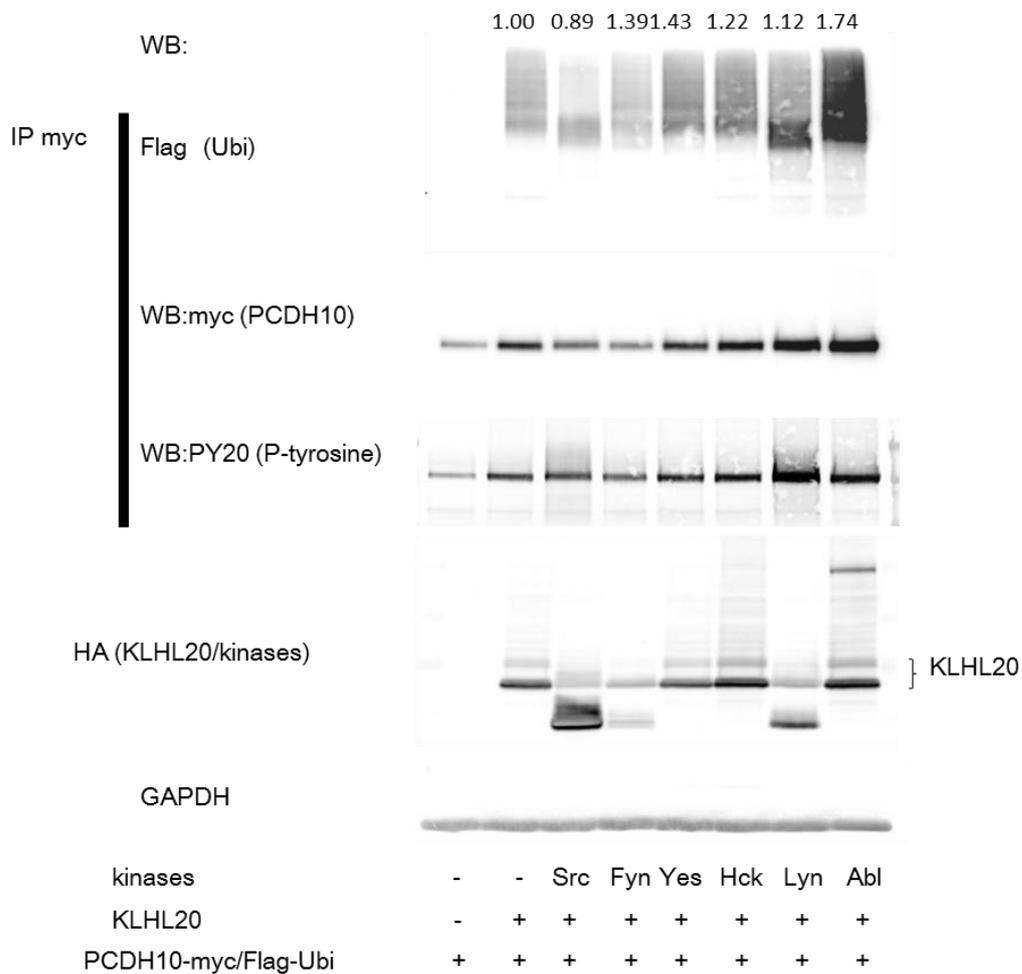


図 34. PCDH10 へのポリユビキチン修飾を促進または抑制するチロシンキナーゼのスクリーニング

293T 細胞に各コンストラクトを強制発現し、24 時間後に細胞を回収して抗 myc 抗体 2.5 μ g を用いて免疫沈降を行った後、各抗体を用いてウエスタンブロットを行った。ポリユビキチンバンド量を PCDH10 バンド量で割り込み、キナーゼをコトランスフェクションしなかった場合と比較した相対値をバンドの上に示した。

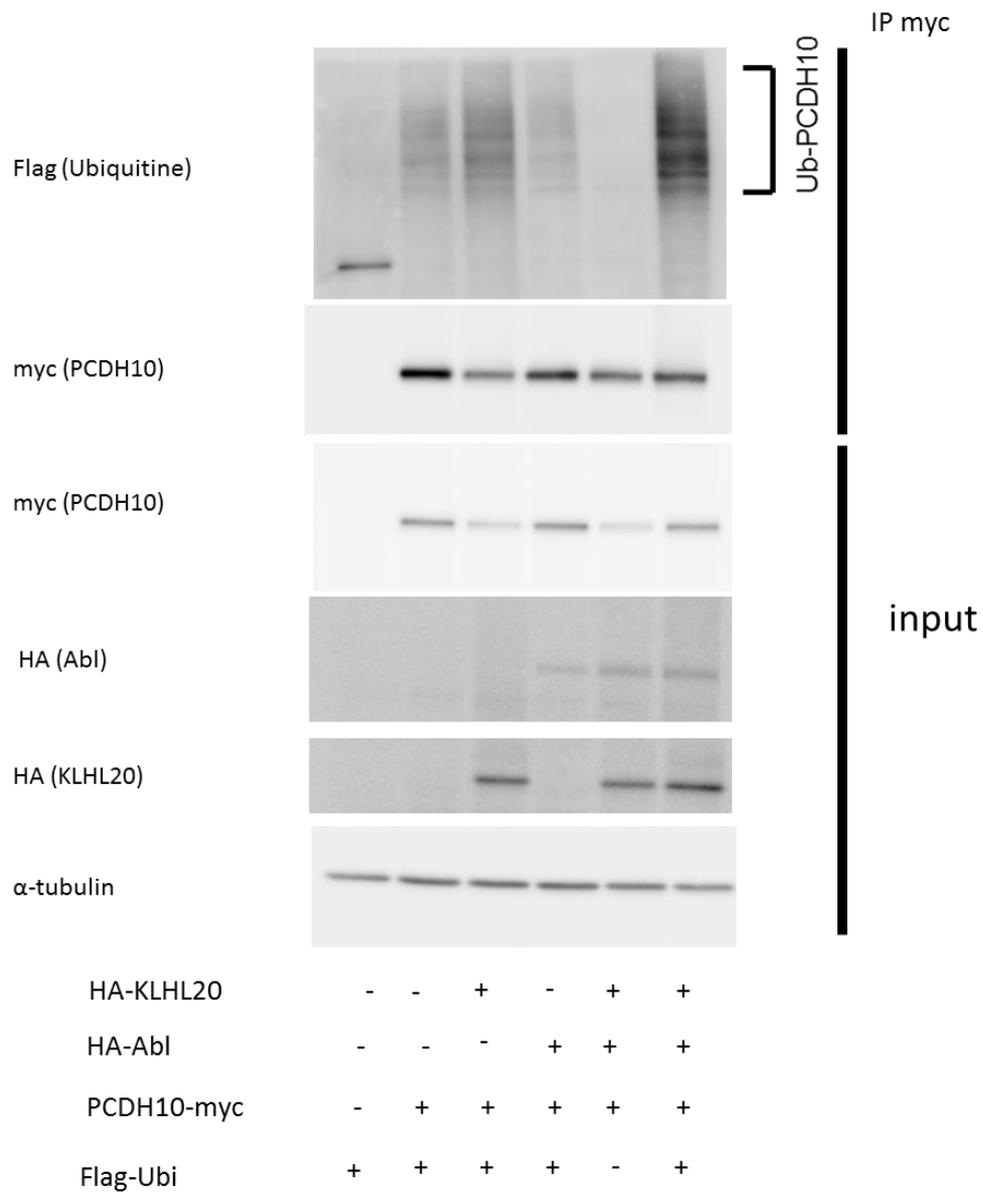


図 35. Abl によって KLHL20 による PCDH10 のポリユビキチン化が促進される

293T 細胞に各コンストラクトを強制発現し、24 時間後に細胞を回収して免疫沈降を行った後、各抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果。

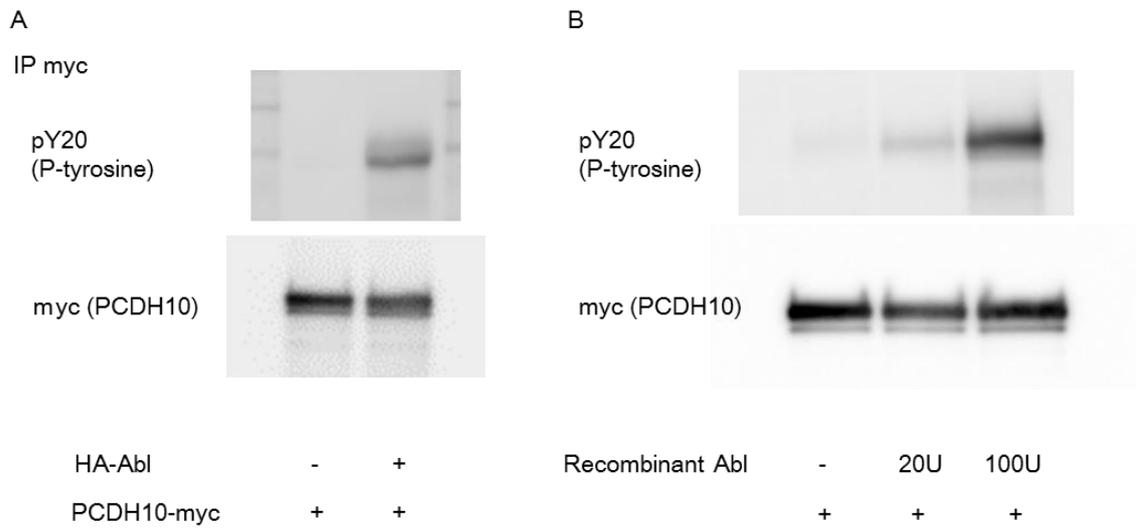


図 36. PCDH10 は in vivo、invitro において Abl によるリン酸化の基質となりうる

(A) in vivo phosphorylation assay の結果。293T 細胞に myc タグ標識した PCDH10 と Abl をコトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収して免疫沈降実験を行った。(B) in vitro phosphorylation assay の結果。293T 細胞に myc タグ標識をした PCDH10 を強制発現して、免疫沈降を行い、in vitro phosphorylation 反応の基質とした。

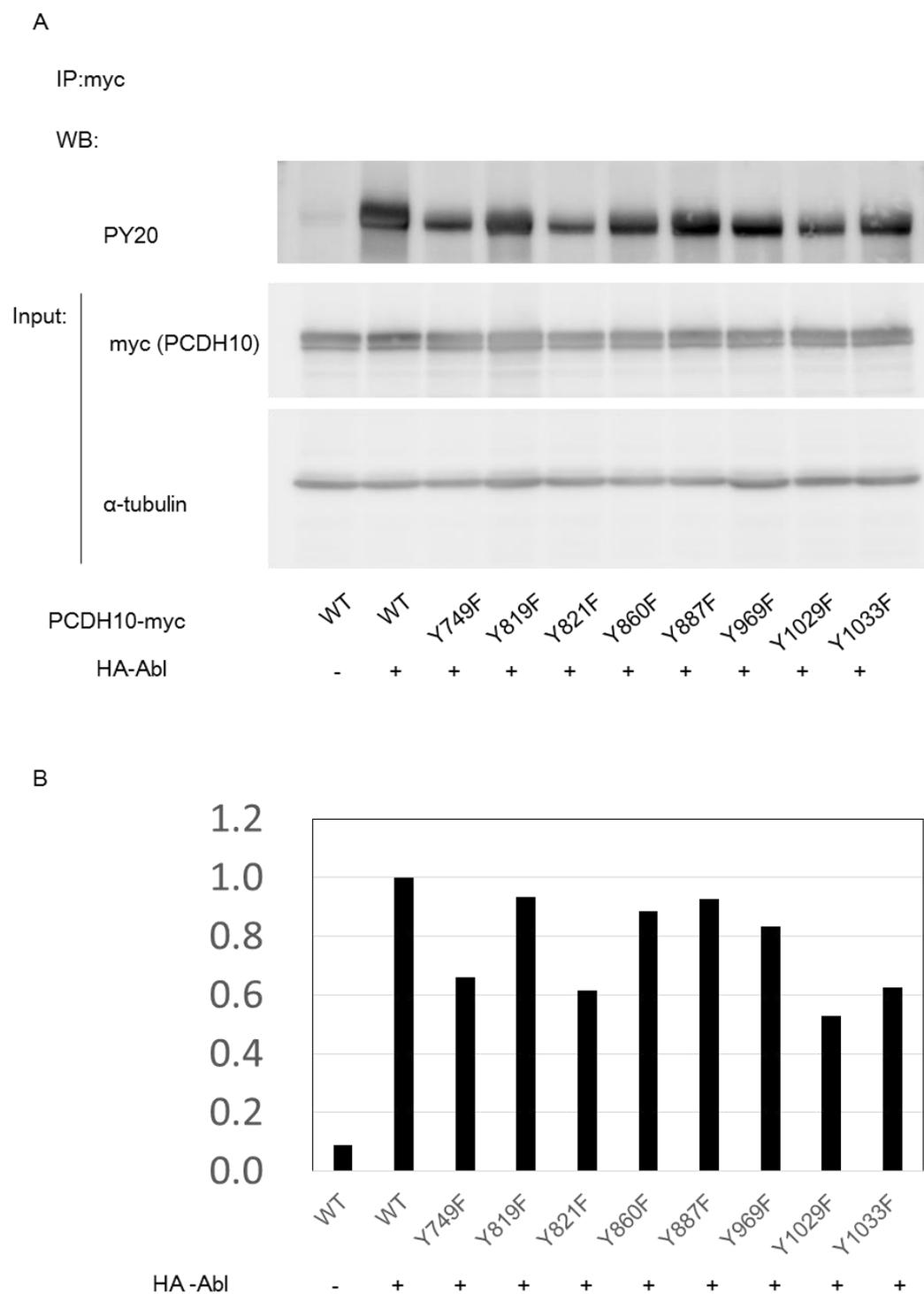


図 37. Abl によってリン酸化を受けるチロシン残基の同定

(A) PCDH10 の各変異体と Abl を 293T 細胞に強制発現して、24 時間後に細胞を回収して免疫沈降実験を行った。(B) 免疫沈降されてきた PCDH10 のバンドを定量した結果。

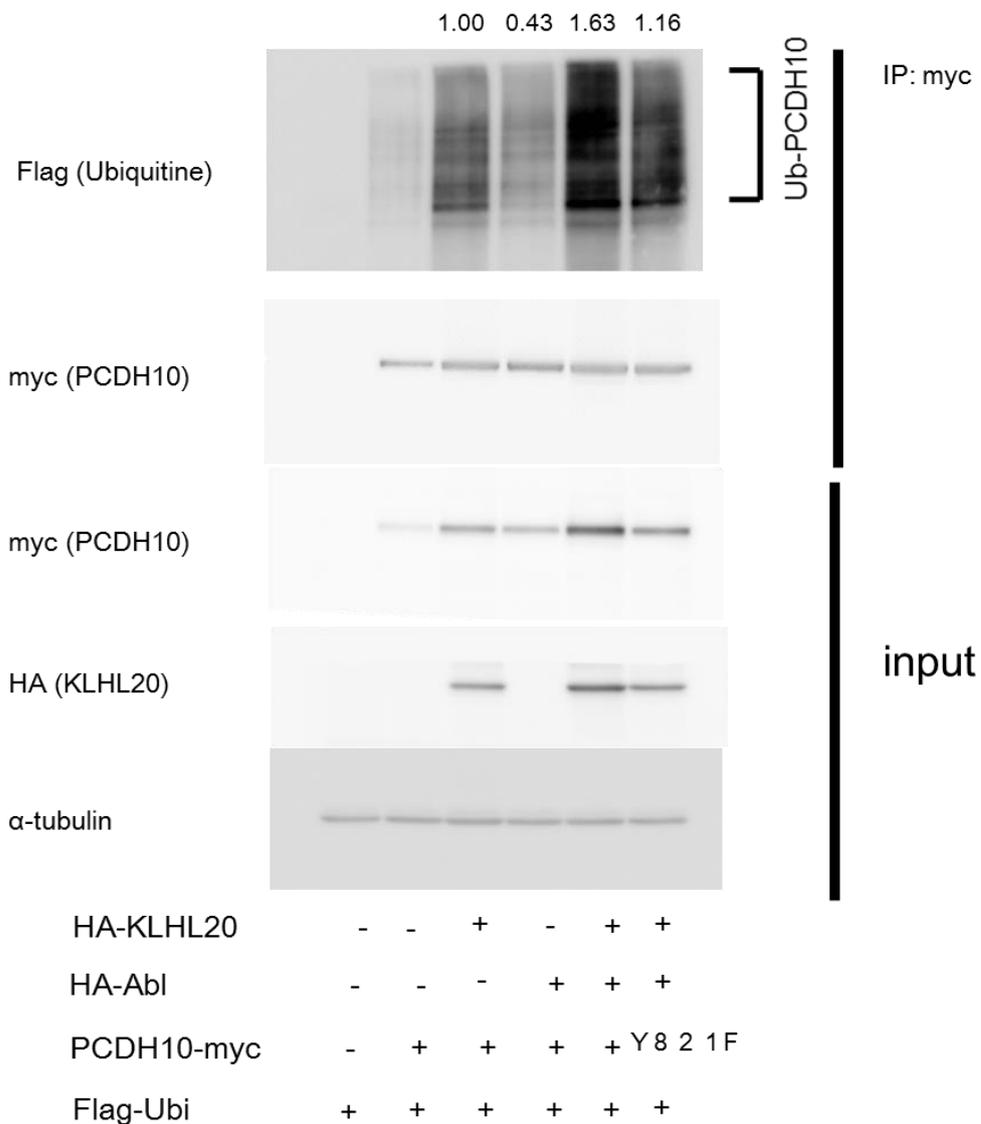


図 38. PCDH10 の 821 番目のチロシン残基のリン酸化は PCDH10 のポリユビキチン化修飾を亢進する

293T 細胞に各コンストラクトを強制発現して 24 時間後に細胞を回収して免疫沈降実験を行った。抗 myc 抗体 $2.5 \mu\text{g}$ を用いて免疫沈降を行った。PCDH10 は WT もしくは 821 番目のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した不活性型の Y821F 変異体を用いた。ポリユビキチンバンド量を PCDH10 バンド量で割り込み、キナーゼをコトランスフェクションしなかった場合と比較した相対値をバンドの上を示した。

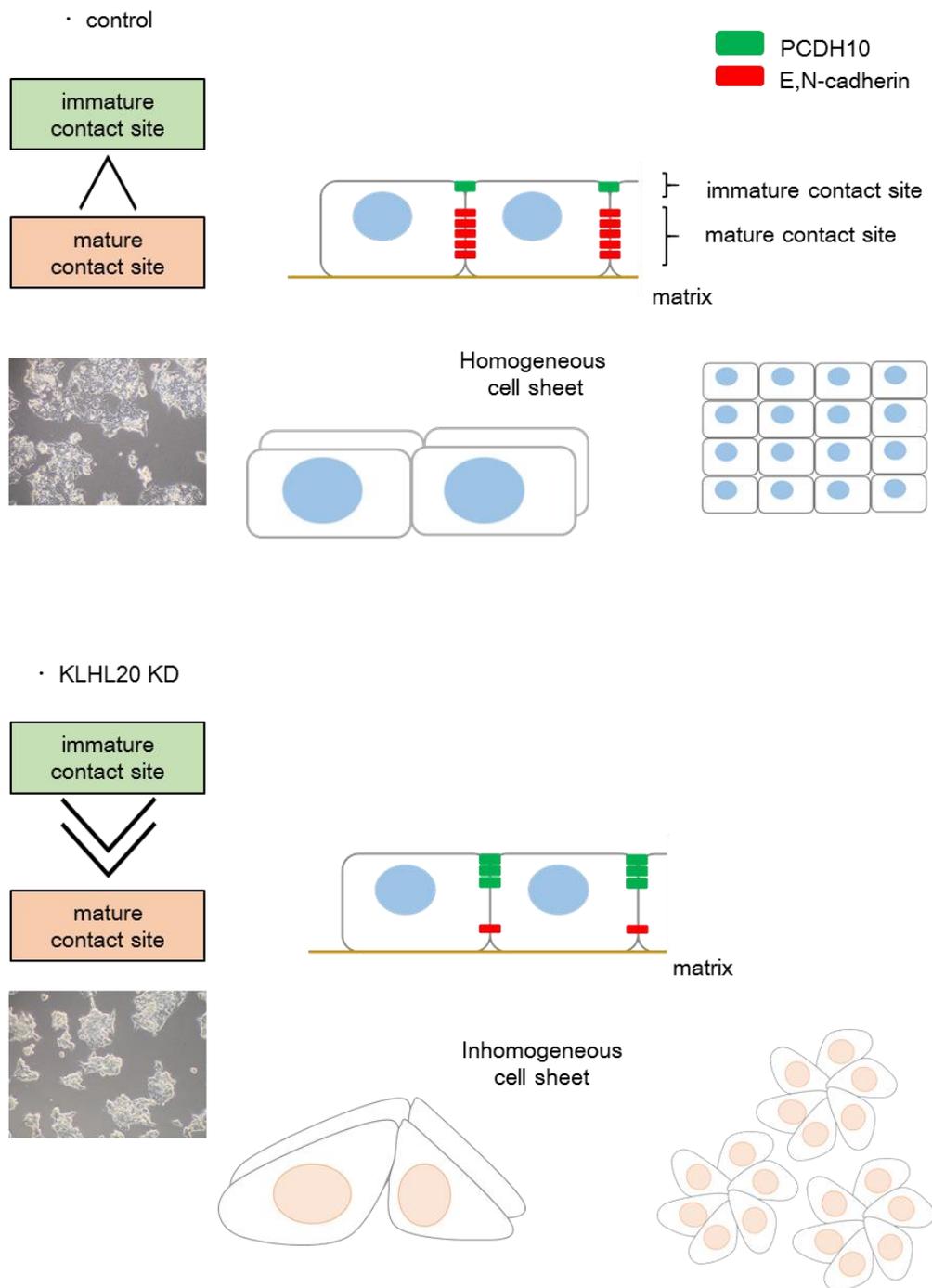


図 39. 本研究のまとめ 1

293FT 細胞において、通常は細胞底部のアドヘレンスジャンクションに存在するカドヘリンが強い結合力を持つことによって、均一な細胞層に保たれているが（上図）、KLHL20 ノックダウンによって細胞の頂端部の膜上に存在する PCDH10 のタンパク質量が局所的に増加することによって、細胞間接着面上部での細胞間結合力が強まり、細胞層全体が盛り上がった形態に変化し、不均一な細胞層になると考えられる（下図）。

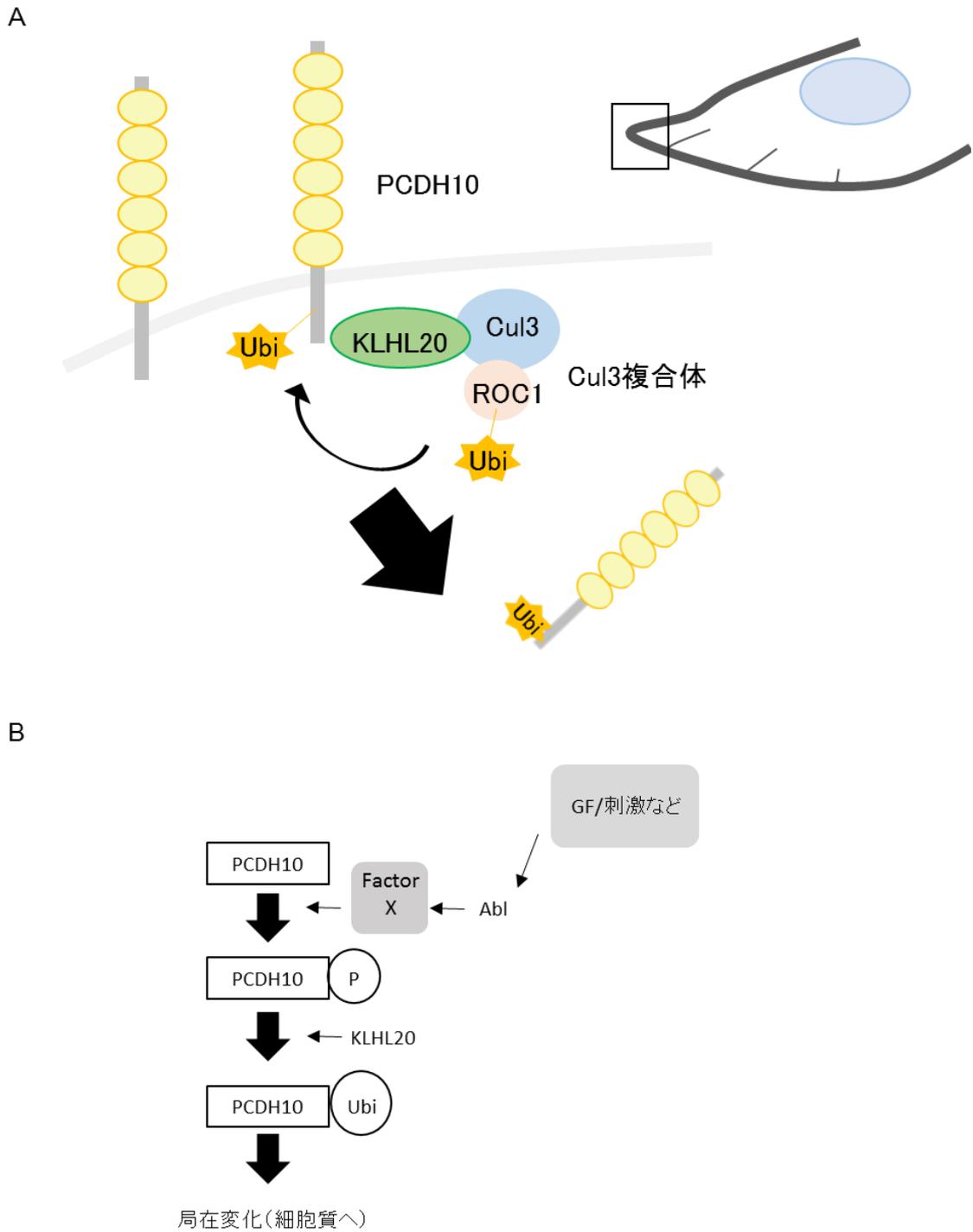


図 40. 本研究のまとめ 2

(A) KLHL20 は PCDH10 に対してポリユビキチン鎖修飾を行う。KLHL20 は PCDH10 のエンドサイトーシスを促進して、膜上に存在する PCDH10 タンパク質を局所的に制御している。(B) PCDH10 に対するポリユビキチン鎖修飾を促進する機構が存在する。

8. 参考文献

1. 日本脳腫瘍学会、日本病理学会 (2010) 脳腫瘍取り扱い規約.
2. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, et al. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828.
3. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, et al. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401.
4. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, et al. (2006) Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9: 391-403.
5. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, et al. (2009) Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4: 568-580.
6. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 895-902.
7. Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737.
8. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65: 10946-10951.
9. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3983-3988.
10. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, et al. (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030-1037.
11. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, et al. (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 973-978.
12. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, et al. (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115.
13. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, et al. (2008) Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451: 345-349.
14. Feuring-Buske M, Hogge DE (2001) Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34(+)CD38(-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 97: 3882-3889.
15. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, et al. (2006) Glioma stem cells promote

- radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760.
16. Suzuki ST (1996) Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily. *J Cell Sci* 109 (Pt 11): 2609-2611.
 17. Redies C, Vanhalst K, Roy F (2005) delta-Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci* 62: 2840-2852.
 18. Hirano S, Yan Q, Suzuki ST (1999) Expression of a novel protocadherin, OL-protocadherin, in a subset of functional systems of the developing mouse brain. *J Neurosci* 19: 995-1005.
 19. Nakao S, Platek A, Hirano S, Takeichi M (2008) Contact-dependent promotion of cell migration by the OL-protocadherin-Nap1 interaction. *J Cell Biol* 182: 395-410.
 20. Uemura M, Nakao S, Suzuki ST, Takeichi M, Hirano S (2007) OL-Protocadherin is essential for growth of striatal axons and thalamocortical projections. *Nat Neurosci* 10: 1151-1159.
 21. Tsai NP, Wilkerson JR, Guo W, Maksimova MA, DeMartino GN, et al. (2012) Multiple autism-linked genes mediate synapse elimination via proteasomal degradation of a synaptic scaffold PSD-95. *Cell* 151: 1581-1594.
 22. Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, Kim TK, Lin Y, et al. (2008) Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* 321: 218-223.
 23. Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, Hasegawa T, Asahara T, et al. (2005) Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer* 116: 407-414.
 24. Ying J, Li H, Seng TJ, Langford C, Srivastava G, et al. (2006) Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation. *Oncogene* 25: 1070-1080.
 25. Bertrand KC, Mack SC, Northcott PA, Garzia L, Dubuc A, et al. (2011) PCDH10 is a candidate tumour suppressor gene in medulloblastoma. *Childs Nerv Syst* 27: 1243-1249.
 26. Zhong X, Zhu Y, Mao J, Zhang J, Zheng S (2013) Frequent epigenetic silencing of PCDH10 by methylation in human colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139: 485-490.
 27. Ying J, Gao Z, Li H, Srivastava G, Murray PG, et al. (2007) Frequent epigenetic silencing of protocadherin 10 by methylation in multiple haematologic malignancies. *Br J Haematol* 136: 829-832.
 28. Narayan G, Scotto L, Neelakantan V, Kottoor SH, Wong AH, et al. (2009) Protocadherin PCDH10, involved in tumor progression, is a frequent and early target of promoter

- hypermethylation in cervical cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 983-992.
29. Wang KH, Liu HW, Lin SR, Ding DC, Chu TY (2009) Field methylation silencing of the protocadherin 10 gene in cervical carcinogenesis as a potential specific diagnostic test from cervical scrapings. *Cancer Sci* 100: 2175-2180.
 30. Yu J, Cheng YY, Tao Q, Cheung KF, Lam CN, et al. (2009) Methylation of protocadherin 10, a novel tumor suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Gastroenterology* 136: 640-651 e641.
 31. Li Z, Li W, Xie J, Wang Y, Tang A, et al. (2011) Epigenetic inactivation of PCDH10 in human prostate cancer cell lines. *Cell Biol Int* 35: 671-676.
 32. Narayan G, Freddy AJ, Xie D, Liyanage H, Clark L, et al. (2011) Promoter methylation-mediated inactivation of PCDH10 in acute lymphoblastic leukemia contributes to chemotherapy resistance. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 1043-1053.
 33. Li Z, Chim JC, Yang M, Ye J, Wong BC, et al. (2012) Role of PCDH10 and its hypermethylation in human gastric cancer. *Biochim Biophys Acta* 1823: 298-305.
 34. Lin YL, Li ZG, He ZK, Guan TY, Ma JG (2012) Clinical and prognostic significance of protocadherin-10 (PCDH10) promoter methylation in bladder cancer. *J Int Med Res* 40: 2117-2123.
 35. Tang X, Yin X, Xiang T, Li H, Li F, et al. (2012) Protocadherin 10 is frequently downregulated by promoter methylation and functions as a tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark* 12: 11-19.
 36. Qu Y, Dang S, Hou P (2013) Gene methylation in gastric cancer. *Clin Chim Acta* 424: 53-65.
 37. Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H (2008) JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* 3: 442-455.
 38. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.
 39. Dhanasekaran DN, Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27: 6245-6251.
 40. Bjorkblom B, Vainio JC, Hongisto V, Herdegen T, Courtney MJ, et al. (2008) All JNKs can kill, but nuclear localization is critical for neuronal death. *J Biol Chem* 283: 19704-19713.
 41. Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252.
 42. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, et al. (2000) Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288: 870-874.
 43. Hardee ME, Zagzag D (2012) Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J*

- Pathol 181: 1126-1141.
44. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, et al. (2010) Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468: 829-833.
 45. Hara T, Ishida H, Raziuddin R, Dorkhom S, Kamijo K, et al. (2004) Novel kelch-like protein, KLEIP, is involved in actin assembly at cell-cell contact sites of Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 15: 1172-1184.
 46. Pintard L, Willems A, Peter M (2004) Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* 23: 1681-1687.
 47. Stogios PJ, Prive GG (2004) The BACK domain in BTB-kelch proteins. *Trends Biochem Sci* 29: 634-637.
 48. Yuan WC, Lee YR, Huang SF, Lin YM, Chen TY, et al. (2011) A Cullin3-KLHL20 Ubiquitin ligase-dependent pathway targets PML to potentiate HIF-1 signaling and prostate cancer progression. *Cancer Cell* 20: 214-228.
 49. Lee YR, Yuan WC, Ho HC, Chen CH, Shih HM, et al. (2010) The Cullin 3 substrate adaptor KLHL20 mediates DAPK ubiquitination to control interferon responses. *EMBO J* 29: 1748-1761.
 50. Lin MY, Lin YM, Kao TC, Chuang HH, Chen RH (2011) PDZ-RhoGEF ubiquitination by Cullin3-KLHL20 controls neurotrophin-induced neurite outgrowth. *J Cell Biol* 193: 985-994.
 51. Hahn N, Dietz CT, Kuhl S, Vossmerbaeumer U, Kroll J (2012) KLEIP deficiency in mice causes progressive corneal neovascular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 3260-3268.
 52. Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A (1980) ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1365-1368.
 53. Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373-428.
 54. Sun ZW, Allis CD (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418: 104-108.
 55. Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T (2009) The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 458: 453-460.
 56. Dikic I, Giordano S (2003) Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* 15: 128-135.
 57. Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, et al. (2002) Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4: 222-231.
 58. d'Azzo A, Bongiovanni A, Nastasi T (2005) E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane

- protein trafficking and degradation. *Traffic* 6: 429-441.
59. Ezhkova E, Pasolli HA, Parker JS, Stokes N, Su IH, et al. (2009) Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell* 136: 1122-1135.
 60. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
 61. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, et al. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125: 301-313.
 62. Fazio TG, Huff JT, Panning B (2008) An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* 134: 162-174.
 63. Foltz G, Yoon JG, Lee H, Ryken TC, Sibenaller Z, et al. (2009) DNA methyltransferase-mediated transcriptional silencing in malignant glioma: a combined whole-genome microarray and promoter array analysis. *Oncogene* 28: 2667-2677.
 64. Pierfelice TJ, Schreck KC, Eberhart CG, Gaiano N (2008) Notch, neural stem cells, and brain tumors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 367-375.
 65. Jeon HM, Jin X, Lee JS, Oh SY, Sohn YW, et al. (2008) Inhibitor of differentiation 4 drives brain tumor-initiating cell genesis through cyclin E and notch signaling. *Genes Dev* 22: 2028-2033.
 66. Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, et al. (2010) Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat Med* 16: 1414-1420.
 67. Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, et al. (2007) Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci* 64: 458-478.
 68. Curtin JF, Cotter TG (2002) Anisomycin activates JNK and sensitises DU 145 prostate carcinoma cells to Fas mediated apoptosis. *Br J Cancer* 87: 1188-1194.
 69. Arnaoutova I, Kleinman HK (2010) In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc* 5: 628-635.
 70. Hubner M, Peter M (2012) Cullin-3 and the endocytic system: New functions of ubiquitination for endosome maturation. *Cell Logist* 2: 166-168.
 71. Leppa S, Bohmann D (1999) Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* 18: 6158-6162.
 72. Parsons JT, Parsons SJ (1997) Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 187-192.

謝辞

本研究においては、様々な先生方の御指導をいただきました。本研究の全般にわたって御指導をいただいた秋山徹先生には心から深く感謝申し上げます。貴重な御助言、研究の場などを快く提供して下さった東京大学分子細胞生物学研究所の先生を初め皆様に深く感謝します。また、臨床データについてのご指導、臨床現場での貴重な体験を賜りました金沢大学医薬保健学類、脳・脊椎機能制御学の先生方をはじめスタッフの皆様には心より感謝いたします。

東京大学先端科学技術研究センター、油谷浩幸教授には、マイクロアレイ解析をご指導いただきました。東京大学理学系研究科、程久美子先生には shRNA を供与していただきました。東京大学医学部脳神経外科の先生方には検体サンプルをいただきました。

最後に、厳しい研究生活を共にしてきた、東京大学分子細胞生物学研究所、分子情報研究分野の皆様には、御迷惑をおかけした御詫びを申し上げますとともに、厚く御礼申し上げます。

2014年3月

越前 佳奈恵