

chemotherapy. 33rd Congress of the Société Internationale d'Urologie, Vancouver, Canada. Sep 9, 2013.

- ⑥ Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma Y, Ino Y, Todo T : NOVEL ONCOLYTIC HSV-1 FOR NONSEMINOMA GERM CELL TUMOR. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会 (岡山)、2013 年 7 月 5 日。
- ⑦ Kakutani S, Fukuhara H, Takeshima Y, Homma Y, Ino Y, Todo T : GROWTH INHIBITION OF TESTICULAR CANCER USING ONCOLYTIC HERPES SIMPLEX VIRUS. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2013 年 10 月 4 日。
- ⑧ 藤村 哲也、福原 浩、久米 春喜、新美 文彩、野宮 明、川合 剛人、永田 政義、山田 大介、鈴木 基文、中川 徹、西松 寛明、榎本 裕、本間 之夫：限局性前立腺癌に対するロボット支援下根治的前立腺全摘除術。第 101 回日本泌尿器科学会総会 (札幌)、2013 年 4 月 28 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (がん関係研究分野))
分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
(希少・難治がんに対するウイルス療法の開発)

研究分担者・中原 寛和
(近畿大学医学部附属病院 歯科口腔外科・准教授)

研究要旨

口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されている。本研究では脳腫瘍のような難治性のがんに対して、安全でかつ強い抗腫瘍効果の確認できた単純ヘルペスウイルス1型を用い、舌癌などの口腔扁平上皮癌の治療に応用し得るかの検討を行った。口腔扁平上皮癌はリンパ節転移が予後を左右する大きな因子となっている。そこで、本研究ではウイルスが局所の殺細胞効果のみならず、転移リンパ節への効果も検討した。さらに口腔扁平上皮癌の特性に応じた特異的に効果を発揮し得る、がん治療用ウイルスの開発と作製を行うことを検討している。

A. 研究目的

近年、ウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変し、癌細胞で選択的に複製するウイルスを癌治療に応用する試みがなされ、特に単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) は癌治療に適した特徴を有することがわかってきた。治療用の増殖型変異HSV-1は、癌細胞に感染すると複製し、その過程で宿主の癌細胞を死滅させる。複製したウイルスは周囲に散らばって再び癌細胞に感染し、その後複製→細胞死→感染を繰り返して抗腫瘍効果を現す。一方、正常細胞に感染した治療用ウイルスは複製せず、正常組織には害が生じない。また腫瘍内でのウイ

ルス増殖は、特異的抗腫瘍免疫を誘導する。従って、ウイルス複製による直接的殺細胞効果と、特異的抗腫瘍免疫の惹起により、特定の治療遺伝子の発現なしに癌を治癒させることが可能で、新しい癌治療法として高いポテンシャルを有している。第二世代の増殖型HSV-1 (G207) は二重変異を有し、脳腫瘍に投与できるよう安全性を重視して世界で初めて臨床用に開発された。本研究代表研究者藤堂によって、治療原理、抗腫瘍効果の機序、他の治療法との併用効果、安全性などが解明された。藤堂らはその開発経験から、G207を改良し、世界で初めて三重変異を有する第三世代遺伝子組

換えHSV-1(G47 Δ)を作製することに成功した。このG47 Δ は、癌細胞におけるウイルス複製能と惹起される抗腫瘍免疫が増強し、安全性を維持しながら抗腫瘍効果が格段に改善した。また高いウイルス濃度が生産できることから実用性が高い。

一方、口腔癌は全癌の数%程度を占めており、手術を中心とした集学的治療が行われており治療の可能な癌の一つになってきた。しかしながら、口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されてきた。さらに、口腔癌の予後因子の一つに頸部リンパ節転移がある。局所は制御できても、リンパ節への転移を制御しなければ、完治は望めない。そこで本研究ではもう一つの目的として、ウイルス療法が転移リンパ節を制御できるかを検討することを目的としている。そのためには有効なモデルが必要である。そして、その効果の検討方法、ウイルスの有効な投与方法の検討が必要になることが予想される。それらを踏まえて本研究では治療用ウイルスを口腔癌に適用し、その実用化に向けた、基礎実験およびマウスモデルを用いた臨床に即した実験を計画した。

B. 研究方法

1) 口腔癌に対するウイルス療法の基礎実験

①培養細胞

アフリカミドリザル腎細胞株Vero、ヒト培養扁平上皮癌細胞としTSU、HOC313、OSC-19、OSC-20、SAS、HSC-3、OSC-4、ヒト肺扁平上皮癌細胞E

BC-1RCRF-LC-S q 1、ヒト食道扁平上皮癌細胞KY SE220、ヒト子宮扁平上皮癌細胞HCS-2 (papilloma virus)、マウス扁平上皮癌細胞KLN205、KLN205-MUC1 (American Type Culture Collection (ATCC) より購入) を用いた。すべての細胞は添付文書により推奨された培地、凍結、継代、維持を行った。

②GFP導入培養細胞

ヒト培養扁平上皮癌細胞OSC-19およびSAS細胞にRetro-XTMQベクターを用いて、GFP (Green fluorescent protein) を導入し、GFP発現ヒト培養扁平上皮癌細胞OSC-19-GFP、SAS-GFPを作製した。培養は親株と同様の培地、凍結、継代、維持を行った。

2) ウイルス複製能

6ウエルプレートにVero細胞を 4.0×10^5 /2mlまき、37°Cで16時間培養した。1%熱非働化FBS添加DPBSにて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 0.02 (8.0×10^3 PFU/0.7ml) のウイルス希釈液を作成した。1%熱非働化FBS添加DPBS 1 mlにてウエルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を0.7ml/ウエルにて1株につき3ウエルずつ感染させ、室温で5分間震盪し、37°Cで1時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非働化FBS添加DMEMを2 ml/ウエル加え、34.5°Cで72時間培養した。ウエルごとに培地と細胞を回収し、ドライアイス・エタノールにて凍結、融解を3回繰り返す、2分間超音波による細胞破碎処理を行い、タイターを測定した。タイター測定は回収されたウエルごとに3枚のプレート、各2ウエルずつをカウントして行い、各株の平均を出した。

3) ウイルス感染能 (entry assay)

24ウェルプレートに細胞 5.0×10^4 /500 μ l/ウェルでまき、37°Cで16時間培養した。1%熱非働化FBS添加DPBSにて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 1.0 で感染させる。感染後6時間で感染をストップさせて、X-gal染色を行い、ウイルスの感染効率を測定した。

4) In vitro におけるウイルスペクターの殺細胞効果

各ウイルスの殺細胞効果について、in vitroにおいては以下のように評価した。細胞間、ウイルス間で比較することができるよう、ウイルス量、感染時間、培養時間などは全て同一条件で行った。6ウェルプレートに細胞を 2.0×10^5 /2mlまき、37°Cで16時間培養した。16時間後に作製したプレートのうち1枚を使用してトリプシン処理にて細胞をはがし、細胞数を測定した。6ウェルの平均細胞数をもとに、1%熱非稼働FBS添化DPBSもてMOI1.0、0.1または0.01の2段階のウイルス希釈系列を作製した。1%熱非稼働化FBS添加DPBS 1 mlにて各ウェルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を0.7ml/ウェルにて各濃度3ウェルずつ感染し、室温で5分間震盪し、37°Cで1時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非稼働化FBS添加DMEMを2ml/ウェル加え、34.5°Cで培養した。24時間ごと4日間にわたり生存する細胞数を測定し、mock感染群における生存細胞数対する、パーセント表示で評価した。細胞数の測定はCoulter counter (Beckman Coulter, CA, USA)にて行った。なお、ヒト由来細胞株にはMOI 1.0および0.1を感染して行った。

5) 動物実験

5-6週のBALB/c nu/nu 雌マウス (ヌードマウ

ス) を使用した。マウスは三協ラボサービスから購入し、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。動物実験は「動物愛護および管理に関する法律」を遵守し、東京大学バイオサイエンス委員会による東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った。なお、動物実験使用するウイルスの希釈には全て10%グリセロール添加PBSを使用した。

6) 皮下腫瘍モデルの作製

マウスの左側腹部に、25G針を使用して、DMEM溶液50 μ l/マウスにて希釈した細胞を皮下注射し、皮下腫瘍を作製した。ヒト扁平上皮癌細胞を使用した実験ではヌードマウスに細胞数 1.0×10^7 個/50 μ l/匹を、それぞれ皮下注射して皮下腫瘍を作製した。最大腫瘍径が5mm大になったときをday0として実験を行った。週に3回腫瘍を測定し、最大径 \times 短径 \times 厚み (mm³) で腫瘍体積を算出して評価した。または生存期間を観察して評価した。片側の皮下腫瘍モデルにおいては腫瘍の最大径が24mmに達したとき安楽死させた。

7) 皮下腫瘍モデルにおけるウイルスの腫瘍内投与実験

最大腫瘍径が5mmになったときをday0として、10%グリセロール添加PBS溶液20 μ l/マウスでウイルスを希釈して、30G針を用いてday0およびday3に腫瘍内投与した。

8) 舌投与頸部リンパ節モデルの作製と頸部リンパ節転移モデルにおけるウイルスの静脈内投与実験

BALB/c nu/nu 雌マウス (ヌードマウス) の舌に30G針を使用してPBSで希釈したSAS細胞 2.0×10^5 個/50 μ l/匹 を舌に投与した。細胞を舌に投与した日

をday0として実験を行った。ウイルスの投与実験では、10%グリセロール添加PBS溶液20 μ l/マウスでウイルスを希釈して、30G針を用いてday 1、3、5に局所投与した。頸部リンパ節の転移数を評価する検討においては、GFPの発現によって評価した。

9) 統計学的解析

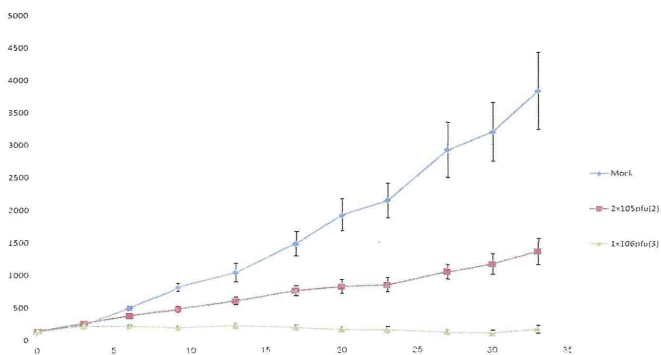
統計学的解析はスチューデントt検定および生存期間の解析についてはKaplan-Meier法にて生存曲線を描き、Log-rank検定を行った。統計解析ソフトはエクセル統計2012 (SSRI) を用いた。

C. 研究結果

ヒト培養扁平上皮癌細胞としTSU、HOC313、OSC-19、SC-20、SAS、HSC-3、OSC-4のG47 Δ ウイルスの殺細胞効果、ウイルス複製能、ウイルス感染効果を検討した結果、殺細胞効果があり、複製能が高く、感染効率 (entry assay) の良好なOSC-19、SAS、HSC-3を以下の実験に使用した。

G47 Δ の扁平上皮癌細胞のヌードマウス皮下モデルでの結果はin vivoにおいてもG47 Δ は十分な殺細胞効果が認められた (図1)。

(図1) G47 Δ のSAS皮下腫瘍への殺細胞効果



青：コントロール、赤：G47 Δ 2.0 \times 10⁵pfu、
緑：G47 Δ 1.0 \times 10⁶pfu投与。

同様の効果はOSC-19細胞でも得られた(結果省略)。

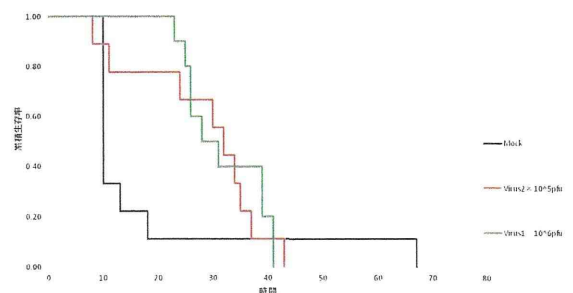
さらにGFPを導入したOSC-19-GFP、SAS-GFPにおいて舌に投与し、顎下リンパ節に転移するかを検討したところ、両細胞とも、有意に顎下リンパ節への転移をGFP発現によって確認できた(図2)。

G47 Δ の扁平上皮癌細胞OSC-19のヌードマウス舌腫瘍モデルでの結果はin vivoにおいてもG47 Δ は十分な殺細胞効果が認められた (図3)

(図2) 顎下線にGFPの発現を認め、顎下リンパ節への転移を確認



(図3) G47 Δ のOSC-19-GFP舌投与への殺細胞効果



黒：コントロール、赤：G47 Δ 2.0 \times 10⁵pfu、
緑：G47 Δ 1.0 \times 10⁶pfu投与。

(図4) G47 Δ を転移リンパ節にて検出

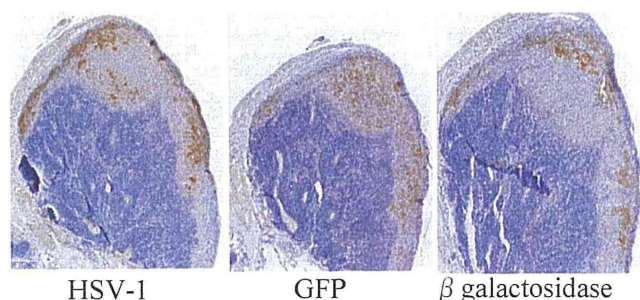


図2で示した頸部リンパ節に転移した段階で舌にG47 Δ 1.0 \times 10⁶ pfu投与を投与したところ、転移したリンパ節転移の縮小とマウスの延命効果が認められた(結果省略)。そこでリンパ節での腫瘍縮小効果はG47 Δ によるものかを検討するため、転移リンパ節でのHSV-1、GFP、 β galactosidaseの免疫染色を施行した(図4)。免疫染色の結果、転移リンパ節において、ウイルス(G47 Δ)が検出された。すなわち舌へ投与したG47 Δ がリンパ節へ移行し、抗腫瘍効果を発揮していることが判明した。

E. 考察

口腔扁平上皮癌細胞に対するウイルス療法の確立を目指し、まずすでに、治療効果安全性の確立されている、第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47 Δ)すなわち増殖型HSV-1ウイルスベクターを用いた治療法が応用できるのかを検討した。In vitro in vivoの実験においては、ウイルス複製能、ウイルス感染能、ウイルス殺細胞効果をスクリーニングとすることにより、OSC-19、SAS、HSC-3を用いて以下の実験を進めた。OSC-19、SAS、HSC-3はウイルス複製能、ウイルス感染能が得られる細胞種であれば、G47 Δ が有効な殺細胞効果を発揮することが明らかとなった。さらに、同様の細胞を用い、舌に投与するモデルでも有効な結果を得られた。この

結果は少なくとも、局所投与に当たっては、G47 Δ が口腔扁平上皮癌の臨床応用に当たり、十分有効性を発揮することを示唆する結果であった。またGFP導入は腫瘍の動態を見るうえで有効な方法であると考えられる。本実験においても転移腫瘍の有効な検出手段となっており、マウス転移作成モデルとして有効に機能すると考えられる。

そして、効率に頸部リンパ節転移をきたす細胞を用いた実験において、G47 Δ は局所における抗腫瘍効果のみならず、転移リンパ節においても抗腫瘍効果を発揮した。そしてそのリンパ節での抗腫瘍効果は単にウイルスが惹起する免疫応答反応による副次的効果ではなく、G47 Δ が直接リンパ節に移行し働いている可能性を強く示唆する結果が得られた。

次年度の実験計画としては、リンパ節転移腫瘍における抗腫瘍効果に対し、いかなる免疫担当細胞が関与しているかの詳細な検討を行いたい。

一方、感染効率の悪い細胞に対する対策として、細胞への感染のメカニズムを詳細に検討することをさらなる検討課題としている。プレリミナリーなデータとしてウイルスに關与する膜タンパクとしてNectin-1が重要な働きをしていることを見出している。その発現によって、感染効率に影響が出ていることが示唆されている。今後その詳細なメカニズムを解明することにより、現時点では感染効率が悪く、G47 Δ によるウイルス治療が期待できないと思われている細胞にも効果を発揮する、扁平上皮癌細胞特異的な武装ウイルスの作製を目指す予定である。

E. 結論

本実験の目的とする口腔扁平上皮癌細胞に対して、第三世代遺伝子組換えHSV-1(G47 Δ)は細胞種を選別することにより、in vitro、in vivoの実験において十分な抗腫瘍効果を発揮することが解った。さらに局所投与において転移リンパ節へも抗腫瘍効果が期待できることが分かった。今後、臨床応用へ向けた研究を進める予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Itoh Y, Nakahara H, et al. : a case report and literature review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 113(5): 23-28, 2012.
 - ② Enomoto A, Uchihashi T, Izumoto T, Nakahara H, et al. : Suppurative arthritis of the temporomandibular joint associated with bisphosphonate: a case report. J Oral Maxillofac Surg 70(6): 1376-1379, 2012.
 - ③ Morimoto Y, Hamada S, Ogura T, Nakahara H, et al. : A case of malignant melanoma discovered as a result of metastatic disease of the temporomandibular joint. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 25(1): 74-78, 2012.
 - ④ 内橋 俊大、中原 寛和、他：下顎骨に発生した良性歯原性腫瘍および悪性腫瘍の鑑別。近大医学誌 37: 87-91, 2012。
 - ⑤ 泉本 貴子、中原 寛和、他：周術期院内紹介患者の歯性感染症治療。近大医学誌 38: 69-72, 2013。
 - ⑥ 岡本 知子、中原 寛和、他：注射用ビスフォスフォネート製剤投与患者の口腔管理についての臨床的検討。近大医学誌 38: 73-77, 2013。
 - ⑦ 榎本 明史、中原 寛和、他：歯性感染症におけるシタフロキサシン(グレースビット)の有効性。Hospital Dentistry & Oral-Maxillofacial Surgery 24: 61-64, 2013。
- ### 2. 学会発表
- ① 下出 孟史、中原 寛和、他. 右側翼口蓋窩に発生した横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) の1例。第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会(広島)、2012年5月17日。
 - ② 岡本 知子、内橋 隆行、中原 寛和、他。注射用ビスフォスフォネート製剤投与患者への系統的口腔管理確立への試み。第43回(社)日本口腔外科学会近畿地方会(大阪)、2012年6月23日。
 - ③ 中原 寛和、松岡 裕大、他。口腔扁平上皮癌細胞における治療標的分子Racの機能解析。第71回日本癌学会学術総会(札幌)、2012年9月21日。
 - ④ 内橋 隆行、中原 寛和、他。注射用ビスフォスフォネート製剤投与患者への系統的口腔管理確立への試み。第57回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会(横浜)、2012年10月20日。
 - ⑤ 中原 寛和、森影 恵里、濱田 傑。当科におけ

る口腔癌の臨床的統計的検討。第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会。（東京）、2013年1月24日。

⑥ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Todo T : A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using G47 Δ , A third generation oncolytic herpes simplex virus type 1. 第19回日本遺伝子治療学会年次学術集会（岡山）、2013年7月4日。

⑦ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T : Therapeutic efficacy of oncolytic virus G47 Δ for oral squamous cell carcinoma in orthotopic tongue cancer models. 第72回日本癌学会学術総会（横浜）、2013年10月4日。

⑧ Uchihashi T, Nakahara H, Ino Y, Fukuhara H, Kogo M, Todo T: A new therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma using oncolytic herpes simplex virus G47 Δ . The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop —Pathogenesis, Gene Regulation and Signal Transduction—, Beijing. Nov 1, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (がん関係研究分野))
分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
(悪性脳腫瘍に対するウイルス療法の開発と臨床製剤製造)

研究分担者・中森 幹人
(和歌山県立医科大学医学部 外科学第2講座・講師)

研究要旨

胃癌の中でも難治性の高いスキルス胃癌に対する癌治療用ヘルペスウイルス製剤の基礎的・臨床的開発を行った。

A. 研究目的

単純ヘルペスウイルスI型 (HSV-1) を遺伝子工学的に改良し、希少・難治癌のひとつであるスキルス胃癌に応用するための基礎的研究を昨年度に引き続き当該年度の研究目的とした。

(倫理面への配慮)

ヒト胃癌動物モデルでの癌治療実験に関しては和歌山県立医科大学動物実験室の指針に基づき、承認を得ている。

B. 研究方法

スキルス胃癌に対してより治療効果の高い癌治療用ヘルペスウイルスの基礎的開発を以下に示す方法で行った。

C. 研究結果

当該年度において、我々が作成したSOCS-3発現型癌治療用ヘルペスウイルス (T-SOCS-3) がヒト胃癌細胞株に対して、より高い複製能に加えて、抗腫瘍効果を有し、さらに、胃癌新鮮切除標本を用いた短期培養系においても、同様の効果を示した。さらに、その抗腫瘍効果が、サイトカインシグナル伝達経路と強く関係しているも判明した。

- ① 治療用ヘルペスウイルスが胃癌細胞株においてより複製効能となるために、SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling-3) に着目し、このcDNAをsubcloningした発現ベクターを作成し、昨年度に用いた方法により、OCS-3発現癌治療用ヘルペスウイルス T-SOCS-3を作成した。
- ② T-SOCS-3の治療効果を胃癌新鮮切除標本を用いた短期培養系において確認した。

D. 考察

難治性胃癌の代表であるスキルス胃癌に対してより複製能を強化した癌治療用ヘルペスウイルス (T-SOCS-3) の治療効果を確認できたため、臨床応

用に向けての更なる解析が今後の課題である。

E. まとめ（結論）

当該年度に作成したSOCS-3発現型癌治療用ヘルペスウイルスのスキルス胃癌に対する治療効果が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H : An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. Int J Cancer 132 (2): 485-494, 2013.

2. 学会発表

- ① 中森 幹人 他：タキサン系薬剤による癌治療用ウイルスの効果増強に関する基礎的検討。第72回日本癌学会学術集会（横浜）、2013年10月。
- ② 松村 修一 他：胃癌に対するSOCS3を用いた癌治療用ヘルペスウイルス。第72回日本癌学会学術集会（横浜）、2013年10月。
- ③ 中森 幹人 他：スキルス胃癌集学的治療におけるタキサン系薬剤の役割と個別化治療の可能性。第86回日本胃癌学会総会（横浜）、2014年3月。

- ④ 加藤 智也 他：胃癌細胞株におけるリボヌクレオチド還元酵素活性およびテロメラーゼ活性の発言の検討。第86回日本胃癌学会総会（横浜）、2014年3月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (がん関係研究分野))
分担研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」
(悪性脳腫瘍に対するウイルス療法の開発と臨床製剤製造)

研究分担者・菅原 稔
(公益財団法人がん研究会 ゲノムセンター・特任研究員)

研究要旨

野生型単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) への 3 つの人為的な遺伝子変異によって高い安全性と強力な抗腫瘍作用を実現した第三世代の遺伝子組換え HSV-1 ウイルスは、遺伝学的背景や発生要因、発生部位、増殖メカニズムに関わらず、あらゆる固形がんにも有効であることが示唆されていることから、ヒトのがんの多様性に対応しうる応用範囲の広さが期待できる。がん研究会では、がん患者の臨床検体から樹立に成功した細胞株や 入手可能な各種ヒトがん細胞株を用いて、このがん治療用 HSV-1 ウイルスが どのようなタイプのがん種や細胞株に より効果的に殺細胞作用を発揮するのかを検証する。また「生体内のヒトがん組織の性質を 最も忠実に再現している」あるいは「ヒトの進行がんの病態に より近い」マウスモデル系を用いた非臨床試験で、HSV-1 ウイルスが 長期にわたり持続的な抗腫瘍効果を発揮しうる より実用的な投与方法を検討し、研究代表者が総括している「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」へ貢献することを目指す。

A. 研究目的

ヒトのがんは、各がん患者の遺伝子多型や遺伝子変異、生活環境等の違いに起因する「多様性」が認められる。これらの要因による「がんの多様性」は、がんの最大の特徴であるとともに、有効な治療法開発の大きな障害となっている。医療技術の進歩にもかかわらず、がんによる死亡率は増加の一途をたどっており、希少がんや難治性がん、標準的な化学療法後に薬剤抵抗性を獲得し有効な

治療法のなくなった再発がんや転移を伴うがん患者に対する 実用性の高い新しい革新的な治療法の開発が待望される。

遺伝子組換え HSV-1 を用いたウイルス療法の最大の特徴は、遺伝学的背景や分子機構に左右されず、前臨床試験では あらゆる固形がんにも有効であることが示唆されている点であり、「がんの多様性」に対処しうる応用範囲の広さが期待でき、実用化へ直結する可能性が高い。そこで、がん研

研究会では、がん患者の臨床検体から樹立に成功した細胞株や入手可能な各種ヒトがん細胞株を用いた非臨床試験をおこない、どのようなタイプのがん種や細胞株により効果的に殺細胞作用を発揮するのかを検証し、希少がんや難治性がんに対するウイルス療法の実用化へ貢献することを目指す。また「生体内のヒトがん組織の性質を最も忠実に再現している」あるいは「ヒトの進行がんの病態により近い」マウスモデル系を用いた非臨床試験で、がん治療用 HSV-1 ウイルスが持続的に抗腫瘍効果を発揮可能なより実用的な投与方法を検討する。

B. 研究方法

遺伝子組換え HSV-1 ウイルスの複製能力は、各がん細胞株へ低い MOI=0.01 で感染させ、48 時間後の 1 ポイントで回収される産生量より算定し評価した。このアッセイ系では、1) がん細胞のなかでのウイルス複製の速さ(何時間で 1 サイクルの複製が完了するか?)、2) 細胞のなかでのウイルス複製の程度(1 サイクルで何倍に増えるか?)、3) ウイルスがどの程度効率よく mono layer の細胞に広がって、次の複製を行うか?(隣接する細胞と、培地を介した遠隔細胞への感染の両方を含む)をあわせて総合的に評価することができる。

また、HSV-1 ウイルスの殺細胞能力は、MOI=0.1 及び 0.01 で、ウイルス感染後、1 日目、2 日目、3 日目の生細胞数の計測より求め、殺細胞効果を評価した。これらの「複製能力と殺細胞

効果」から、総合的に HSV-1 ウイルスの抗腫瘍効果を判定し評価した。

がん研究会ではがん患者の腫瘍組織から樹立に成功した細胞株や入手可能な各種ヒトがん細胞株を用いて、どのようなタイプのがん種や細胞株にがん治療用 HSV-1 ウイルスの直接的な殺細胞作用がより効果的に発揮されるのかを検証する。特に、腹水、腹膜播種といった転移・進行がんモデルへの応用の可能性の高い腹部臓器由来のヒト培養細胞株である卵巣がん、胃がん、膵がん等の解析を優先しておこなう。これらのがん種は臨床例も多く、有効な治療法の開発は社会貢献度も高いので、できるだけ数多くの細胞株を解析して評価する。

また、これまでにウイルスの腫瘍内への直接投与により抗腫瘍効果が認められた報告は多いが、他の投与経路で十分に検討された報告は少ない。他事業において、ヒトがん患者の腫瘍組織を免疫不全マウスへ移植し、ジェノグラフト樹立の成功率が 20~30% である系が確立されている。そこで、これらのマウスモデルの中から、がん患者への HSV-1 ウイルス療法を行う前臨床段階として、ヒトの進行がんの病態により近いマウスモデルを選定し、臨床上汎用性の高い静脈内あるいは腹腔内投与での持続的な抗腫瘍効果や副作用の有無を検証する準備を開始する。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え HSV-1 ウイルスを使用する実験を開始するにあたり、がん研究会において、新たに、第二種使用拡散防止措置の文部科学大臣確認

を受けた。これまでは、平成22年3月25日に文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室へ大臣確認実験を申請し、平成22年4月14日に承認（21受文科振第1502号）されたが、その有効期限は平成26年3月までであった。そのため、前回大臣確認申請で承認された細胞株に、今回新たにヒトがん細胞株を追加し、更に今後3年の大臣確認実験の申請をおこなった。具体的には、まず始めに平成25年12月3日に公益財団法人がん研究会機関内の「遺伝子組換え実験安全委員会」で二種省令との整合性について確認・承認され、文部科学大臣へ申請することが認められた。次に、平成25年12月24日に文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室へ大臣確認実験を申請し、平成26年2月19日に承認された（25受文科振第2385号、平成29年3月31日まで有効）。

「遺伝子組換え実験」は、公益財団法人がん研究会 遺伝子組換え実験安全規程に準じておこない、適切な拡散防止措置を講じる。更に「動物実験の取り扱い」については、公益財団法人がん研究会 動物実験等取扱規程に準じておこなう。

C. 研究結果

HSV-1 ウイルス療法の個別化医療への応用に向けて、遺伝子組換え HSV-1 ウイルス感染が誘導する細胞死の作用機序の解明、ならびにこのウイルス療法が有効であるがん患者を事前に予測し得る候補遺伝子を検索するため、平成25年度も継続してできるだけ数多くのヒト培養がん細胞株の解析をおこなった。

胞株の解析をおこなった。

解析したヒトがん細胞株の多くは、がん種に関わらず、高い MOI=0.1 のがん治療用 HSV-1 ウイルスに高感受性であった。興味深いことに、ウイルスの複製効率は各がん細胞株で異なり、ある特定のがん種で特異的に高い、といったような一定の傾向は認められなかった。また、たとえ同一のがん種であっても複製効率は各細胞株によって異なり、複製能の高いがん細胞株は、必ずしも HSV-1 ウイルスによる殺細胞感受性が高いわけではなかった。このような結果は、有効な治療法開発を困難にしている「がんの多様性」を反映している可能性が高い。したがって、がん治療用 HSV-1 ウイルスの治療効果や有効性を事前に予測するには、同一がん種で、できるだけ数多く解析した細胞株を「高感受性」と「低感受性」に分別し、両者の遺伝子発現プロファイルを比較し、HSV-1 ウイルス感染感受性に関与している候補遺伝子を探索する必要がある。そこで、まず始めに、in vitro における低い MOI=0.01 の HSV-1 ウイルスを用いて解析したがん細胞株を、抗腫瘍効果により、「高感受性群」と「低感受性群」及び両者の「中間群」の3グループに分類した。現在、これら「高感受性群」と「低感受性群」の遺伝子発現プロファイルを比較し、HSV-1 ウイルス感染感受性に関与している候補遺伝子の探索及びこれらの候補遺伝子の発現抑制による実証実験の準備に着手した。

研究代表者らは、これまでにがん治療用 HSV-1 ウイルスの膠芽種への腫瘍内直接投与において、ウイルスに起因する特記すべき有害事象

は無かったことを報告している。したがって、まず始めに、膠芽種以外で、がん研で樹立に成功あるいは入手可能ながん細胞株で、腹水、腹膜播種といった転移モデル作製に応用可能な腹部臓器由来の卵巣がん、胃がん、膵がん細胞株を優先に HSV-1 感染感受性を解析し評価した。その結果、in vitro の解析において、いずれのがん細胞株も高い MOI=0.1 を用いることにより、大部分は高感受性であった。これらのがん種の有効な治療法の開発は、臨床例も多いことから社会的貢献度も高い。それゆえ、他事業で開発された「生体内のヒトがん組織の性質を最も忠実に再現している」、あるいは「ヒトの転移や進行がんの病態により近い」マウスモデルを精査・選定し、臨床上汎用性の高い投与方法によるウイルスの持続的な抗腫瘍効果や有害事象を検証するための準備を開始した。現在、HSV-1 ウイルス治療法は皮下腫瘍への直接投与のみならず、進行がんモデルに対する他の投与方法においても十分な腫瘍増殖抑制効果を発揮し、生存率改善の評価に加えて、有害事象の有無を経過観察している。

D. 考察

これまでに解析した種々のがん種のヒト培養がん細胞株において、がん治療用 HSV-1 ウイルスの強力な殺細胞効果を十分に確認することはできたが、HSV-1 ウイルスの複製能力と殺細胞効果との相関性は必ずしも認められなかった。したがって、HSV-1 ウイルスによる直接的な殺細胞の作用機序を解明するためには、さらに継続しがん種や例数を増やして解析評価し、「高感受性

群」と「抵抗性群」を比較検証する必要がある。

また、臨床応用を考えた際、がん患者の治療後の生命に大きく影響を与える要因は、薬剤抵抗性を獲得した「再発がん」や「転移がん」であることから、「ヒトの転移や進行がんの病態により近い」マウスモデル系を用いて、がん治療用 HSV-1 ウイルスが持続的に抗腫瘍効果を発揮可能なより実用的な投与方法を開拓し、「抗腫瘍効果」と「有害事象」の有無の両面から検証可能なシステムを構築し、総合的に評価する必要がある。

長期にわたって持続的な抗腫瘍作用を発揮可能な HSV-1 ウイルス療法は、既存の治療法との併用で相乗的な効果が期待でき、また副作用の蓄積や骨髄抑制が低く、反復投与が可能、といった利点を兼ね備えている。一般にがん治療薬としての実用性の高さは、「効果を発揮するのに必要な量」と「副作用を引き起こす量」の差である「治療域の広さ」に依存することから、十分な治療域の広さが見込まれているこの HSV-1 ウイルス療法は、革新的な治療法になる可能性が高い。

E. 結論

がん治療用 HSV-1 ウイルスは、多くのがん種のヒト培養細胞株で高感受性であることを確認することができ、第三世代のがん治療用 HSV-1 は、強力な抗腫瘍作用と高い安全性から、「がんの多様性」に対応しうる応用範囲の広さが期待される。しかしながら、HSV-1 ウイルス感染後、複製能力の高いがん細胞株は、必ずしも細胞増殖抑制効果が高いわけではなかったことから、HSV-1 ウイルス感染による直接的な殺細胞作用

に關与している遺伝子群やそれらの遺伝子産物に起因する作用機序は、現時点では十分に理解できていない。

どのようなタイプのがん患者が より効果的であるのかを事前に予測し、効率的で有用な臨床応用へ向けて、作用機序の解明は必要不可欠な今後の重要課題である。加えて、このウイルス療法は実用化へ直結する可能性が極めて高いため、ヒトの転移や進行がんの病態に より近いマウスモデル系で十分に検証し、評価する必要がある。そのため、「生体内のヒトがん組織の性質を 最も忠実に再現している」、あるいは「ヒトの進行がんの病態に より近い」マウスモデル系の選定を含めた、より実用的なウイルス投与方法と 持続的な抗腫瘍効果や副作用の有無を評価可能なシステムを構築するための準備を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Wada Y, Matsuura M, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, Noda T, Miki Y. : Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip exon array. J Clin Bioinforma 4(1): 3, 2014 (doi: 10.1186/2043-9113-4-3).

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

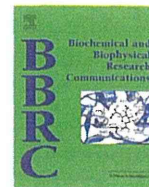
書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|---------------|-------|------|-----|-----|-----|
| | なし | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|----------------------------|--------|------------------------------|------|
| Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Sabit H, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N, Akiyama T | PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. | Biochem Biophys Res Commun | 441(1) | 13-18 | 2014 |
| Koyama-Nasu R, Hruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K, Akiyama T | The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. | Oncogene | May 20 | doi:10.1038/onc.2013.168. | 2013 |
| Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T | The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. | Oncogene | 32(33) | 3840-3845 | 2013 |
| Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H | An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. | Int J Cancer | 132(2) | 485-494 | 2013 |
| Sato YT, Fukuhara H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Nishimatsu H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y | Long-term results of radical prostatectomy with immediate adjuvant androgen deprivation therapy for pT3N0 prostate cancer. | BMC Urology | 14(13) | doi:10.1186/1471-2490-14-13. | 2014 |

| | | | | | |
|---|--|------------------|--------|-----------|------|
| Taguchi S, Nakagawa T, Hattori M, Niimi A, Nagata M, Kawai T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Ishikawa A, Kume H, Homma Y | Prognostic Factors for Metastatic Urothelial Carcinoma Undergoing Cisplatin-based Salvage Chemotherapy. | Jpn J Clin Oncol | 43(9) | 923-928 | 2013 |
| Kamei J, Nishimatsu H, Suzuki E, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Homma Y | Risk factors for septic shock in acute obstructive pyelonephritis requiring emergency drainage of the upper urinary tract. | Int Urol Nephrol | 46(3) | 493-497 | 2013 |
| Nishimatsu H, Suzuki E, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Homma Y | Adrenomedullin and Angiotensin-1 Additively Restore Erectile Function in Diabetic Rats: Comparison with the Combination Therapy of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiotensin-1. | J Sex Med | 10(7) | 1707-1719 | 2013 |
| Yamada D, Nishimatsu H, Kumano S, Hirano Y, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Enomoto Y, Kume H, Homma Y | Reduction of prostate cancer incidence by naftopidil, an $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonist and transforming growth factor- β signaling inhibitor. | Int J Urol. | 20(12) | 1220-1227 | 2013 |



PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells



Kanae Echizen^a, Mitsutoshi Nakada^{b,*}, Tomoatsu Hayashi^a, Hemragul Sabit^b, Takuya Furuta^b, Miyuki Nakai^a, Ryo Koyama-Nasu^a, Yukiko Nishimura^a, Kenzui Taniue^a, Yasuyuki Morishita^c, Shinji Hirano^d, Kenta Terai^e, Tomoki Todo^f, Yasushi Ino^f, Akitake Mukasa^f, Shunsaku Takayanagi^f, Ryohei Ohtani^f, Nobuhito Saito^f, Tetsu Akiyama^{a,*}

^aLaboratory of Molecular and Genetic Information, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

^bDepartment of Neurosurgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa 920-8641, Japan

^cDepartment of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

^dDepartment of Neurobiology and Anatomy, Kochi Medical School, Kochi University, Okoh-cho, Nangoku-City, Kochi 783-8505, Japan

^eLaboratory of Function and Morphology, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

^fDepartment of Neurosurgery, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2013

Available online 6 January 2014

Keywords:

Protocadherin PCDH10

OL-protocadherin

Glioblastoma

Tumorigenicity

Proliferation

ABSTRACT

Protocadherin10 (PCDH10)/OL-protocadherin is a cadherin-related transmembrane protein that has multiple roles in the brain, including facilitating specific cell–cell connections, cell migration and axon guidance. It has recently been reported that PCDH10 functions as a tumor suppressor and that its over-expression inhibits proliferation or invasion of multiple tumor cells. However, the function of PCDH10 in glioblastoma cells has not been elucidated. In contrast to previous reports on other tumors, we show here that suppression of the expression of PCDH10 by RNA interference (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.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Protocadherin10 (PCDH10)/OL-protocadherin is a transmembrane protein that has 6 cadherin domains in the extra cellular region and belongs to the δ 2-protocadherin family of proteins [1–3]. PCDH10 is concentrated at cell–cell junctions and promotes aggregation, although its aggregative strength is weaker than that of classical cadherins [4]. Furthermore, PCDH10 recruits the Nap1-WAVE complex at the sites of cell–cell contact and promotes reorganization of the actin cytoskeleton, which results in accelerated cell migration on confluent cell monolayers [5]. In neuronal cells, PCDH10 is localized along the axons, is concentrated in the growth cones and is involved in axon guidance [5,6].

It has recently been reported that CpG islands within PCDH10 are highly methylated and epigenetically silenced in many tumors, including breast cancer, nasopharyngeal, esophageal carcinoma and haematological malignancies and this is associated with poor prognosis [7–12]. It has also been reported that overexpression

of PCDH10 significantly inhibits proliferation or invasion of multiple tumor cells *in vitro* [9,11].

Glioblastoma is a highly invasive and progressive tumor type, with an overall 5-year survival rate of less than 5% [13]. In the present study, we examined whether PCDH10 also exerts a tumor suppressive function in glioblastoma cells. We unexpectedly found that PCDH10 is required for the proliferation and tumorigenicity of glioblastoma cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and tumor specimens

Following informed consent, tumor samples classified as primary glioblastoma were obtained from patients undergoing surgical treatment at Kanazawa University Hospital and the University of Tokyo Hospital as approved by the Institutional Review Board. The human astrocytoma cell lines U87, U251, T98G and LN229 (ATCC) were cultured in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cell lines GB1–16 were cultured in DMEM/F-12 containing B27 supplement (GIBCO), EGF and FGF2 (20 ng/ml each, Wako) on laminin-coated culture dishes [14–16].

* Corresponding authors. Fax: +81 76 234 4262 (M. Nakada), +81 3 5841 8482 (T. Akiyama).

E-mail addresses: mnakada@med.kanazawa-u.ac.jp (M. Nakada), akiyama@iam.u-tokyo.ac.jp (T. Akiyama).

2.2. Antibodies

Mouse monoclonal antibody (mAb) to PCDH10 (5G10) was prepared as described previously [6]. mAbs to α -tubulin, Flag M2 and Ki67 were purchased from CALBIOCHEM, Sigma–Aldrich and Leica Biosystems, respectively. Rabbit polyclonal antibody to GFP was from Santa Cruz.

2.3. Immunohistochemistry

Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks were sectioned (6 μ m thick) onto slides and then deparaffinized. Slides were microwaved for 15 min in target retrieval solution (pH 6.0; Dako). Internal peroxidases were blocked by incubation in 0.3% H₂O₂ solution in methanol for 20 min. Non-specific staining was blocked by a 30 min incubation with blocking solution (5% skim milk, 0.1% Tween20 in TBS). Sections were immunostained with the ABC kit (VECTOR). Anti-PCDH10 (5G10), anti-Ki67 and anti-GFP antibodies were used at a dilution of 1:200. Sections were exposed to diaminobenzidine peroxidase substrate (Funakoshi) for 5–10 min and counterstained with Mayer's hematoxylin. Non-immune rat IgG was used as a negative control. All images were taken by bright field microscopy AX80 (Olympus). Ki67 index was calculated as the number of Ki67-positive cells per 1.0×10^3 cells in each of 6 fields per sample.

2.4. Lentivirus production

The entry vector pENTRH1 (obtained from K. Ui-Tei), the lentiviral vector CS-RfA-CG and the packaging vectors pCAG-HIV-gp and pCMV-VSV-G-RSV-Rev (provided by H. Miyoshi) were used for lentivirus production. The target sequences for shRNA are as follows: luciferase, 5'-GATTTCGAGTCGCTTAATGT-3'; DsRed, 5'-GCCCCGT AATGCAGAAGAAGA-3'; human PCDH10#2, 5'-GTGCGTGGCAAC-GAAATGAAC-3'; human PCDH10#4, 5'-GAGAAGAAGCTCAACATC-TAT-3'. Infection efficiency was monitored by GFP expression driven by the CMV promoter.

2.5. Single-cell migration assay

Time-lapse images were obtained at 5-min intervals for 4 h using a microscope (IX81; Olympus) equipped with a cooled CCD camera CoolSNAP K4 (Photometrics). GB2 cells (1×10^3 cells) infected with shRNA-expressing lentiviruses for 3 days (MOI = 6) were plated on laminin-coated, glass-bottom, 24-well plates (Iwaki) and GFP signals were traced. Trace drawing and statistical analyses were performed with IMARIS Track (BitPlane) and Excel (Microsoft), respectively. The box plots were presented as described previously [5].

2.6. In vitro invasion assay

In vitro invasion assays were performed using 24-well Biocoat Matrigel invasion chambers (BD Biosciences). GB2 cells (1.0×10^5 cells per well) infected with shRNA-expressing viruses for 4 days (MOI = 3) were starved overnight with DMEM/F-12 medium and allowed to migrate toward the underside of the top chamber for 24 h. The lower chamber was filled with DMEM/F12 containing 10% FBS. Cells in the top chamber were removed and the number of infiltrated cells was counted by Cell Titer-Glo assays. Infiltrated cells were fixed with methanol and subjected to HE staining (Merck).

2.7. Cell proliferation assay

Cell viability was determined using the Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega). Luminescence was measured on a Mithras LB 940 (Berthold).

2.8. Pcdh10

The full-length PCDH10 variant 1 cDNA (obtained from Q. Tao) was subcloned into the pIRES hrGFP 3 \times Flag vector (Adigent). 3 \times Flag tagged PCDH10 was subcloned into the pENTR4 dual selection vector (Invitrogen).

2.9. Apoptosis assay

Apoptotic cells were detected using the Annexin V-Biotin Apoptosis Detection Kit (MBL) and labeled with Streptavidin-APC conjugates (S888, Invitrogen). A minimum of 5×10^3 cells were analyzed with flow cytometer Canto II (BD Bioscience) and FlowJo 8.8.7 software (TreeStar, Ashland, OR).

2.10. Sphere formation assay

GB2 cells infected with shRNA-expressing lentiviruses (MOI = 3) for 3 days were plated on 96-well tissue culture plates (1000, 500 or 250 cells per well) and cultured for 2 weeks. Spheres were photographed by In Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) and analyzed by Developer 1.9.1 software (GE Healthcare).

2.11. Real time PCR

Real time PCR was performed as described previously [14]. The results were normalized to the detected values for GAPDH. Primer sequences are as follows: PCDH10 sense, 5'-AGGCCCTTCACAG-CACTCT-3'; antisense, 5'-GACTAGCATATCCTTTCCGTGTC-3'; GAPDH sense, 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'; antisense, 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'.

Immunoblotting analysis and tumor formation assays were performed as described previously [14].

3. Results and discussion

3.1. PCDH10 is expressed in glioblastoma cells

We established eight glioblastoma cell lines under serum-free conditions [14–16]. These cell lines retained clonogenic potential and were highly tumorigenic when transplanted into immunocompromised mice. Immunoblotting analysis with anti-PCDH10 antibody revealed that most of these cell lines expressed substantial levels of PCDH10 protein (Fig. 1A), in contrast to previous reports showing weak or no expression in many other tumor types. In particular, PCDH10 was abundantly expressed in GB2 and GB3 cells. By contrast, PCDH10 was not expressed at detectable levels in four commonly used glioblastoma cell lines, LN229, T98G, U251 and U87MG, which are cultured in serum-containing medium. Furthermore, immunohistochemical analysis showed that 11 out of 19 patient specimens (57.9%) were positive for PCDH10 (Fig. 1B and Supplementary Table 1). In addition, we found that PCDH10 was expressed in neurons but not in astrocytes or oligodendrocytes from normal human brain (data not shown).

3.2. PCDH10 is required for glioblastoma cell migration and invasion

It has been reported that PCDH10 binds to the Nap1-Wave complex and controls the migration of U251 cells [5]. We therefore

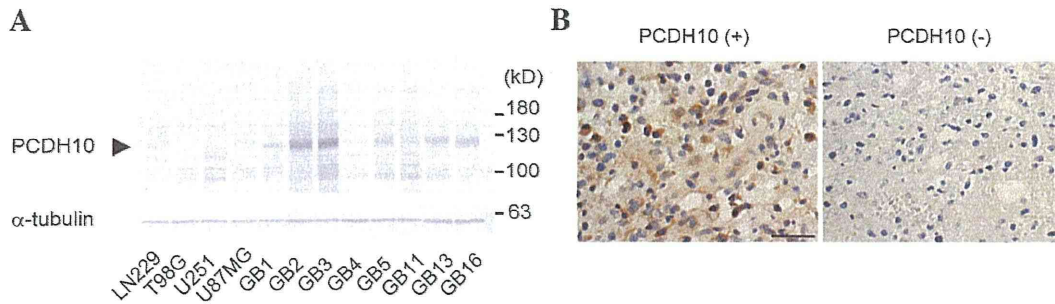


Fig. 1. Expression of PCDH10 in glioblastoma cells. (A) Lysates from glioblastoma cells were subjected to immunoblotting analysis with anti-PCDH10 antibody. LN229, T98G, U251 and U87MG were cultured in serum-containing medium, and GB1~16 cells were cultured in serum-free medium. The arrowhead indicates PCDH10. α -Tubulin was used as a control. (B) Histological examination of patients' samples. Tissue sections were stained with anti-PCDH10 antibody. Representative sections from PCDH10-positive (Left) and -negative (Right) tumors are shown. Scale bars, 20 μ m.

used time-lapse microscopy to examine whether PCDH10 plays a role in migration of glioblastoma cells cultured on laminin-coated dishes. We found that infection of GB2 cells with a lentivirus expressing an shRNA targeting PCDH10 resulted in a significant decrease in cell migratory activity (sh-luciferase vs sh-PCDH10#2, $p = 0.021$; sh-luciferase vs sh-PCDH10#4, $p = 0.00059$) (Fig. 2A and B), as well as a decrease in PCDH10 protein levels (Supplementary Fig. 1), but did not affect adhesion to laminin-coated dishes (Fig. 2C). Since glioblastoma is a highly invasive tumor [13,17], we also performed Matrigel invasion assays. We found that knockdown of PCDH10 resulted in a decrease in the invasive activity of GB2 cells (sh-luciferase vs sh-PCDH10#2, $p = 0.034$; sh-luciferase vs sh-PCDH10#4, $p = 0.042$) (Fig. 2D and E). These results suggest

that PCDH10 has the potential to promote migration and invasion of glioblastoma cells.

3.3. Knockdown of PCDH10 induces the growth arrest and apoptosis of glioblastoma cells

It has recently been shown that overexpression of PCDH10 inhibits the proliferation of multiple tumor cells *in vitro* [9,11]. We therefore investigated the significance of PCDH10 in the proliferation of three glioblastoma cell lines, GB2, GB3 and GB16, in which PCDH10 is abundantly expressed (Fig. 1A). Cell Titer-Glo assays revealed that infection of these cells with a lentivirus expressing an shRNA targeting PCDH10 resulted in a decrease in

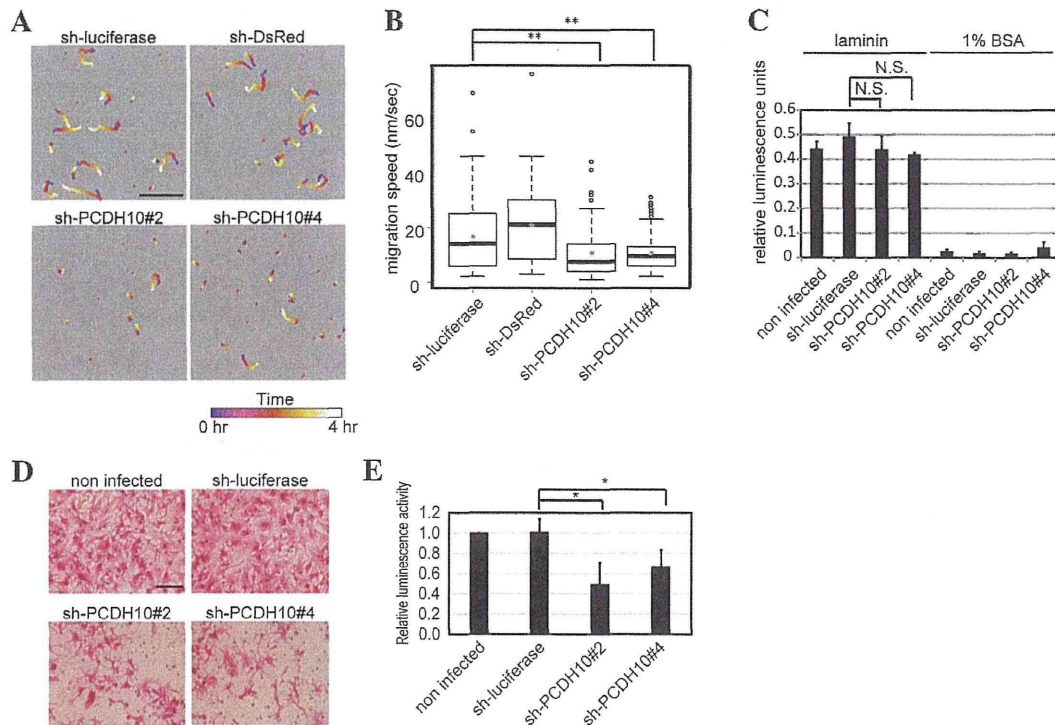


Fig. 2. PCDH10 is required for the migration and invasion of glioblastoma cells. (A and B) GB2 cells were infected with the indicated shRNA-expressing lentivirus at MOI = 6. Time-lapse images were taken at 5-min intervals for 4 h. (A) One representative field of each sample. Tracks of individual cells that neither divided nor contacted other cells were analyzed. Scale bar, 400 μ m. (B) Images were taken from 9 fields per sample. The number of cells analyzed was: sh-luciferase, $n = 140$; sh-DsRed, $n = 131$; sh-PCDH10#2, $n = 138$; sh-PCDH10#4, $n = 158$. Bars indicate medians and magenta dots indicate means ($n = 4$). $**p < 0.01$. (C) GB2 cells were infected with the indicated shRNA expressing lentivirus at MOI = 6. Cells were re-plated 5 days after the infection. Adherent cell numbers were determined by Cell Titer-Glo assays. Dishes coated with 1% BSA were used as controls. Results are shown as average of 4 wells \pm SD. $*p < 0.05$. (D and E) GB2 cells were infected with the indicated shRNA-expressing lentivirus at MOI = 3. 1.0×10^5 cells were allowed to migrate toward the underside of the top chamber for 24 h. (D) HE staining of the invaded cells. Scale bar, 100 μ m. (E) Cell Titer-Glo assays of the invaded cells. Results are shown as average of 3 wells \pm SD. $*p < 0.05$.