

Title	淡明細胞型腎細胞癌のLOXL2 によるインテグリン発現制御機構
Author(s)	長谷, 拓明
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34400
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士論文

淡明細胞型腎細胞癌の LOXL2 による
インテグリン発現制御機構

細胞生理学分野

長谷 拓明

目次

目次	1
緒論	2
本論	4
第1章 ccRCC 臨床検体を用いた解析遺伝子の抽出	4
第1節 実験材料と実験方法	4
第2節 ccRCC 臨床検体を用いた Exon array 解析	7
第3節 ccRCC 臨床検体を用いた DNA methylation array 解析	12
第4節 解析候補遺伝子 LOXL2 の抽出	17
第5節 小括	18
第2章 LOXL2 発現抑制 ccRCC 細胞株の表現型解析	19
第1節 実験材料と実験方法	19
第2節 ccRCC 細胞株の LOXL2 発現解析及び siRNA によるノックダウン解析	22
第3節 LOXL2 ノックダウン 786-O の細胞形態評価	23
第4節 LOXL2 ノックダウン 786-O の増殖性解析	23
第5節 LOXL2 ノックダウン 786-O の遊走能・浸潤能解析	24
第6節 小括	24
第3章 ccRCC 細胞株における LOXL2 によるインテグリン機能調節機構	25
第1節 実験材料と実験方法	25
第2節 ccRCC におけるインテグリン発現パターン	28
第3節 LOXL2 がインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現に及ぼす影響	29
第4節 LOXL2, インテグリン $\alpha 5$ ノックダウン 786-O のフィブロネクチン接着性	30
第5節 LOXL2 ノックダウンが他のインテグリン family 発現に及ぼす影響	30
第6節 インテグリン $\alpha 5$ ノックダウンによる 786-O 表現型解析	31
第7節 LOXL2 ノックダウンによるインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ 発現調節機構	32
第8節 LOXL2 ノックダウン時におけるインテグリン 分解機序についての解析	33
第9節 LOXL2 ノックダウンが小胞体ストレスマーカー遺伝子発現に及ぼす影響	34
第10節 LOXL2 による Ero1La 発現誘導	35
第11節 ccRCC 臨床検体における各遺伝子の発現解析	35
第12節 小括	36
総括	37
結論	40
謝辞	41
参考文献	42

緒論

腎細胞癌(renal cell carcinoma : RCC) は腎臓に発症する癌の80% 以上を占める。わが国におけるRCC の好発年齢は50 歳～70 歳。10 万人当たりの発症率は男性が8.5 人、女性が3.2 人となっており、女性よりも男性の罹患者数が多い癌である (Fig. 1)。RCC は病理学的診断により、淡明細胞型腎細胞癌 (clear cell renal cell carcinoma : ccRCC) が80% を占める。その他の細胞型としては、乳頭状(10 – 15%)、嫌色素製(4 – 5%)、ペリニ管(集合管)癌 (1% 未満)などがある(1,2)。

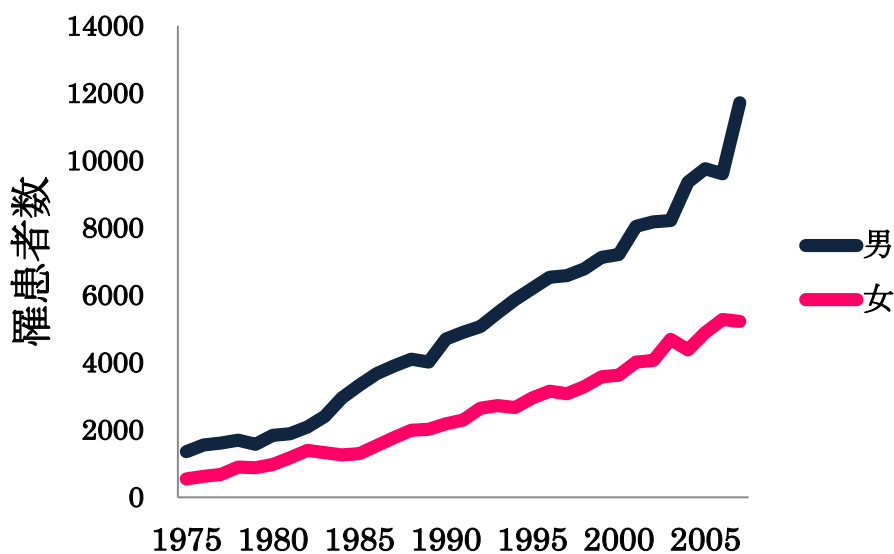


Fig. 1 腎・尿路(膀胱を除く)癌の罹患者数年次推移(国立がん研究センターがん対策情報センター)。

またリスクファクターの喫煙や肥満、高血圧などが複合的に作用して発癌リスクを高めると考えられている。RCC の諸症状は、血尿、側腹部腫瘍や側腹部痛等であるが、これらの症状は RCC 特異的なものではなく、他の腎臓疾患にも起こり得るものであることから、RCC の発見は画像診断法に基づく偶発的な例が多い。現在までに RCC 特異的な腫瘍マーカーは報告されておらず、RCC を判別可能な分子マーカーの探索が盛んに行われている(3)。

RCC の病期は原発巣の大きさや所属リンパ節或いは遠隔転移の有無より分類されTNM 分類と呼ばれているが、初期段階のstage I 期では5 年生存率が99% であるのに対し、後期の stage IV 期では5 年生存率が約21% と劇的に予後不良になり、RCC 治療の大きな課題となっている(Fig.2)。

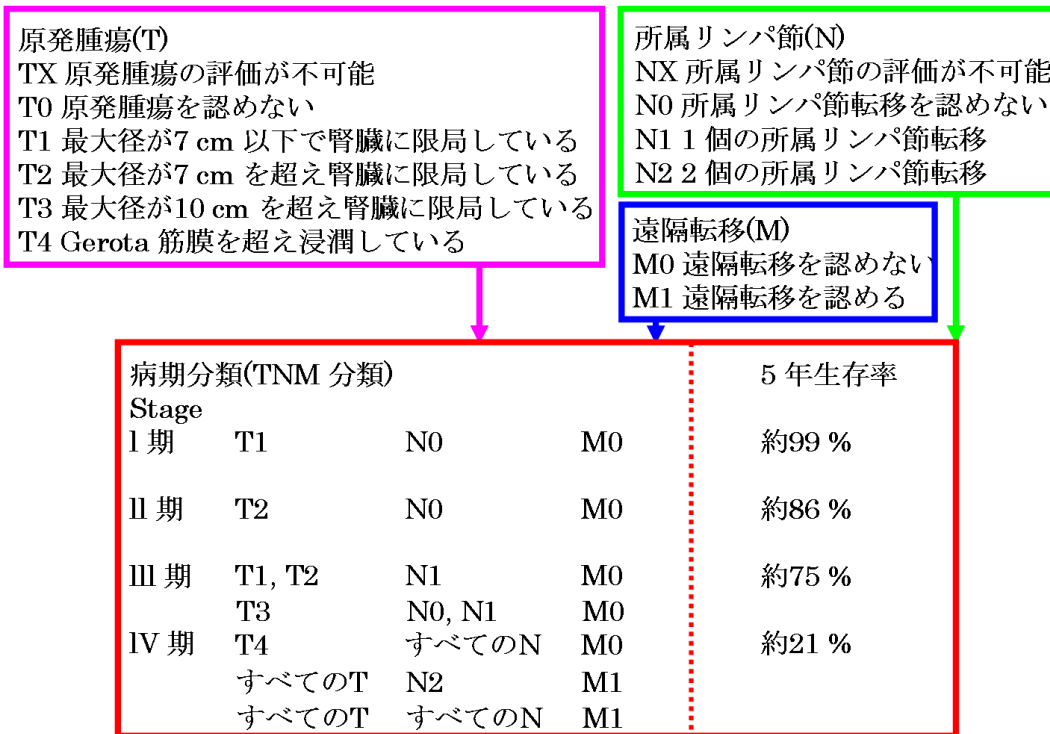


Fig. 2 RCC の分類

現在RCC の治療は、限局性の症例では外科的切除が有効な治療法である。一方、進行例や転移性 RCC に対しても外科手術が有益と判断されれば切除手術が行われるが、不可能な例に対しては主に内科的治療法が選択されている。抗癌剤を用いた化学療法は有効でないことが知られており、インターフェロンや インターロイキン 2 を用いたサイトカイン療法が標準的治療として使用されてきた。しかしながら、奏効率わずか約15% であり、強い副作用も問題となっている。近年では分子標的薬、特にチロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ等がFDA の承認を受け用いられており有意な治療効果を挙げているが、奏効率は約30% 程度でありまた副作用の問題があることから、更なる安全且つ有効な分子標的薬の登場が望まれている。

RCC で最も頻度の高いccRCC について、遺伝子レベルの異常として注目されているのが癌抑制遺伝子Von Hippel-Lindau (VHL) である。ccRCC においてはこのVHL が機能的に欠失している場合が多く、細胞の生存や血管新生を促す遺伝子の転写が恒常的に活性化されるために異常な細胞増殖や浸潤、転移につながると考えられてきたが、未だ不明な点が多く残されている(4)。

これらのことより、RCCに対する有効な分子標的薬の開発にはさらなるRCC の分子基盤の理解が重要な課題である。

そこで本研究では、大阪大学医学部泌尿器科と協力しRCC の中でも発症頻度の最も高いccRCC について増殖や浸潤転移に関する分子メカニズムの理解を目標とし研究に着手した。

本論

第1章 ccRCC 臨床検体を用いた解析遺伝子の抽出

ccRCC において高発現している遺伝子を網羅的解析により探索し, ccRCC の分子レベルの特徴把握に向け研究を行う事とした. 大阪大学医学部泌尿器科協力の下, 臨床検体を用いて Exon array, DNA methylation array を行った.

第1節 実験材料と実験方法

臨床検体

大阪大学医学部泌尿器科の協力により, Exon array, DNA methylation array に ccRCC の正常部位及び癌部がペアになった検体, 計8 検体を用いた. その検体情報を以下 に示す. なお, ccRCC には核異型度に基づく grade 分類が有り, G1 – G3 に分けられ悪性度の指標となっている.

Table 1 Exon array, DNA methylation array に用いた臨床検体情報

検体	Stage	TNM 分類	Grade	予後
A	I 期	T1N0M0	G2	癌無し生存
B	II 期	T3N0M0	G2	癌死
C	III 期	T3N0M1	G2	癌有り生存
D	IV 期	T4N0M0	G3	癌死

また, バリデーション解析には Table 2 に示す ccRCC 臨床検体を用いた.

Table 2 real-time PCR に用いた ccRCC 臨床検体.

A. 2010 年 8 月から 2012 年 8 月の期間において大阪大学医学部附属病院にて手術を受けた 31 例の非癌部・癌部ペアで揃っている ccRCC 臨床検体.

B. 2002 年 1 月から 2012 年 12 月の期間において大阪大学医学部附属病院にて手術を受けた 90 例の癌部 ccRCC 臨床検体.

A

T 分類	T1	19 例
	T2	3 例
	T3	8 例
	T4	1 例
Grade	G1	12 例
	G2	15 例
	G3	4 例
Stage	I	19 例
	II	3 例
	III	6 例
	IV	3 例

B

T 分類	T1	33 例
	T2	23 例
	T3	33 例
	T4	1 例
Grade	G1	26 例
	G2	57 例
	G3	7 例
Stage	I	27 例
	II	11 例
	III	15 例
	IV	37 例

Total RNA 抽出, cDNA 合成

Total RNA を抽出する際には、臨床検体を QIAzol (QIAGEN) 700 μ L と破砕用 ϕ 5mm ジルコニアビーズ 1 個が入ったサンプルチューブに入れ、Micro smash MS-100 (TOMY) を用いて破砕し、ホモジネートを得た。破砕条件としては、4800 rpm、30 秒を 2 回繰り返して、途中 1 分間の氷上放置とした。組織ホモジネートにクロロホルム 140 μ L を添加して混和後、12,000 g で 15 分間遠心し、得られた水層を RNA 抽出に用いた。全自動核酸抽出装置 QIAcube (QIAGEN) を使用し、miRNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出精製した。

cDNA 合成には PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いた。この時、Total RNA は 500 ng を用いて行い、合成反応後の cDNA は MiliQ 水により 10 倍希釈してから実験に使用した。

RNA 濃度測定と純度確認

Exon array には濃度・純度を測定した Total RNA を使用した。Total RNA の濃度測定には極微量分光光度計 Nano Drop (Thermo Fisher Scientific) を使用した。また純度の確認には Total RNA 1 μ L を Experion RNA StdSens Analysis chip (BIO-RAD) に添加し、全自動チップ電気泳動システム Experion Automated Electrophoresis station (BIO-RAD) にて解析した。なお RNA 純度は、RQI (RNA Quality Indicator) を指標とした。RQI は、RNA の完全性を 1 (分解度が極めて高い) から 10 (分解していない) の間の数値で表され、Exon array 解析には RQI が 7 より大きい値の RNA を用いた。

Exon array 解析

検体 A,B,C,D の非癌部・癌部臨床検体 Total RNA 100 ng を用いて、Ambion WT Expression Kit (Applied Biosystems) により cDNA 合成を行った。得られた cDNA 5.5 μ g を GeneChip WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix) により断片化、ビオチン化した。ビオチン化された cDNA をもとに Hybridization Cocktail を作成後、GeneChip Human Exon 1.0 ST Array (Affymetrix) に注入し、45°C、60 rpm で 17 時間 hybridization を行った。Hybridization 終了後、Fluidics Station (Affymetrix) を使用して GeneChip Hybridization Wash and Stain Kit (Affymetrix) により array の自動洗浄・染色を行い、GeneChip Scanner 3000 によりスキャンした。データ解析は、Gene Spring 12.1 (Agilent Technologies) を用いた。

PATHWAY 解析

Web ツールである DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を利用した。

DNA methylation array 解析

ccRCC 臨床検体組織片を RLT buffer (QIAGEN) 600 μ L と破砕用 ϕ 5mm ジルコニアビーズ 1 個が入ったサンプルチューブに入れ, Micro smash MS-100 (TOMY) にて破砕した. 破砕条件は, 4800 rpm, 30 秒を 2 回繰り返した. この組織ホモジネートを, 15000rpm で 3 分間遠心後, その上清を DNA 抽出に用いた. DNA 抽出には, AllPrep DNA スピンカラム (QIAGEN) を使用した.

抽出した DNA を極微量分光光度計 Nano Drop を用いて濃度を測定した. アガロースゲル電気泳動により, DNA が分解していないことを確認した. この DNA を用いて, DNA メチル化解析を行った. 解析には, Infinium HumanMethylation450 BeadChip (illumine) を用いた.

Real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

Real-time PCR にはガラスキャピラリーを用いるタイプの light cyclers (Roche) または, 96 well plate で測定可能な CFX96 Real-Time System (BIO-RAD) の測定機械を用いた. Light cyclers を使用した際には, 2 \times SYBR Premix Ex Taq (Takara) 5 μ L, 10 μ M primer (forward 鎖, reverse 鎖) 各 0.2 μ L (終濃度 ; 0.2 μ M) ずつ, MiliQ 水 3.6 μ L を添加後, 測定を開始した. また, CFX96 Real-Time System を使用した際には light cyclers 使用時の倍量の反応液を用いた. LOXL2 mRNA 量の定量には以下のプライマーを用い,

Forward: 5'- TTCCCTGGGGAGAGGGACATACA -3'

Reverse: 5'- TTCTTCATGGGGTCCAGTGACA -3'

95 $^{\circ}$ C 30 秒 \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 15 秒, 60 $^{\circ}$ C 10 秒, 72 $^{\circ}$ C 15 秒を 50 サイクル \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 15 秒 \rightarrow 40 $^{\circ}$ C 30 秒の条件で反応を行った.

第2節 ccRCC 臨床検体を用いた Exon array 解析

ccRCC 癌部において発現が亢進している遺伝子を探索する目的で、8 検体それぞれの非癌部・癌部とのmRNA 発現の差異(fold change) を求め、絶対値が2 以上の違いがある遺伝子を発現変化があるとした。

まず、各臨床検体の非癌部・癌部を比較し発現に変化のある遺伝子をdifferentially expressed として評価すると、全体約10% 前後の遺伝子の発現が癌部で変化していることが分かった。また、その中で癌部での発現が亢進或いは低下しているものに分けると、やや発現の低下を示す遺伝子が多い傾向にあった(Fig. 3 - 6)。

癌部で発現亢進が示された遺伝子数は検体A で556 遺伝子、検体B で973 遺伝子、検体C で638 遺伝子、検体D では827 遺伝子であった。Web ツールのDAVID 内で利用可能なKEGG_PATHWAY データベースを参照して発現亢進が示唆された遺伝子がどのようなシグナル伝達経路に寄与する遺伝子であるかを評価すると、cytokine-cytokine receptor interaction や p53 signaling pathway, focal adhesion 等のシグナル伝達経路に関わる遺伝子の割合が高い結果となった。しかしながら、各検体で大きな固体差が認められた。

そこで、手術後生存症例であるA・C 検体と手術後癌死した予後不良症例のB・D 検体に分け共通して発現亢進している遺伝子を解析することで予後不良につながるシグナル伝達経路が推察できないかと考えた。KEGG_PATHWAY 解析の結果、B・D 検体で共通して発現亢進している遺伝子群としてECM (extracellular matrix) receptor interaction と、focal adhesion に関するものが挙げられた(Fig. 7)。ECM receptor がECM から受け取った細胞外シグナルは、focal adhesion を介して細胞内へ増殖や運動性シグナルとして伝達されることが知られている (5)。予後不良な症例においてECM receptor interaction と、focal adhesion の各シグナル伝達経路が非常に重要な意味を持つ可能性が示唆された。

A

Tumor vs Normal

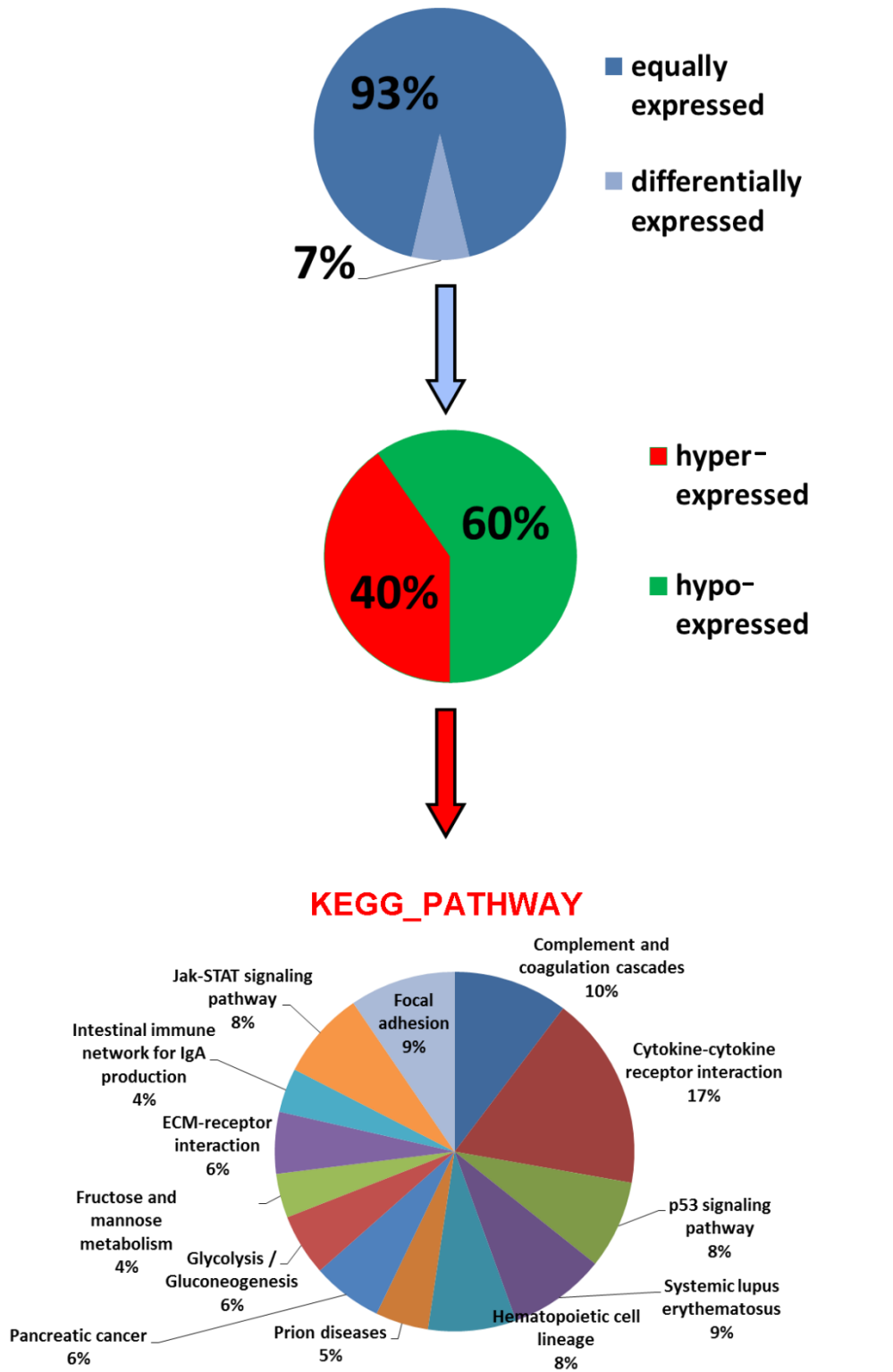


Fig. 3 検体 A の Exon array 解析.

B

Tumor vs Normal

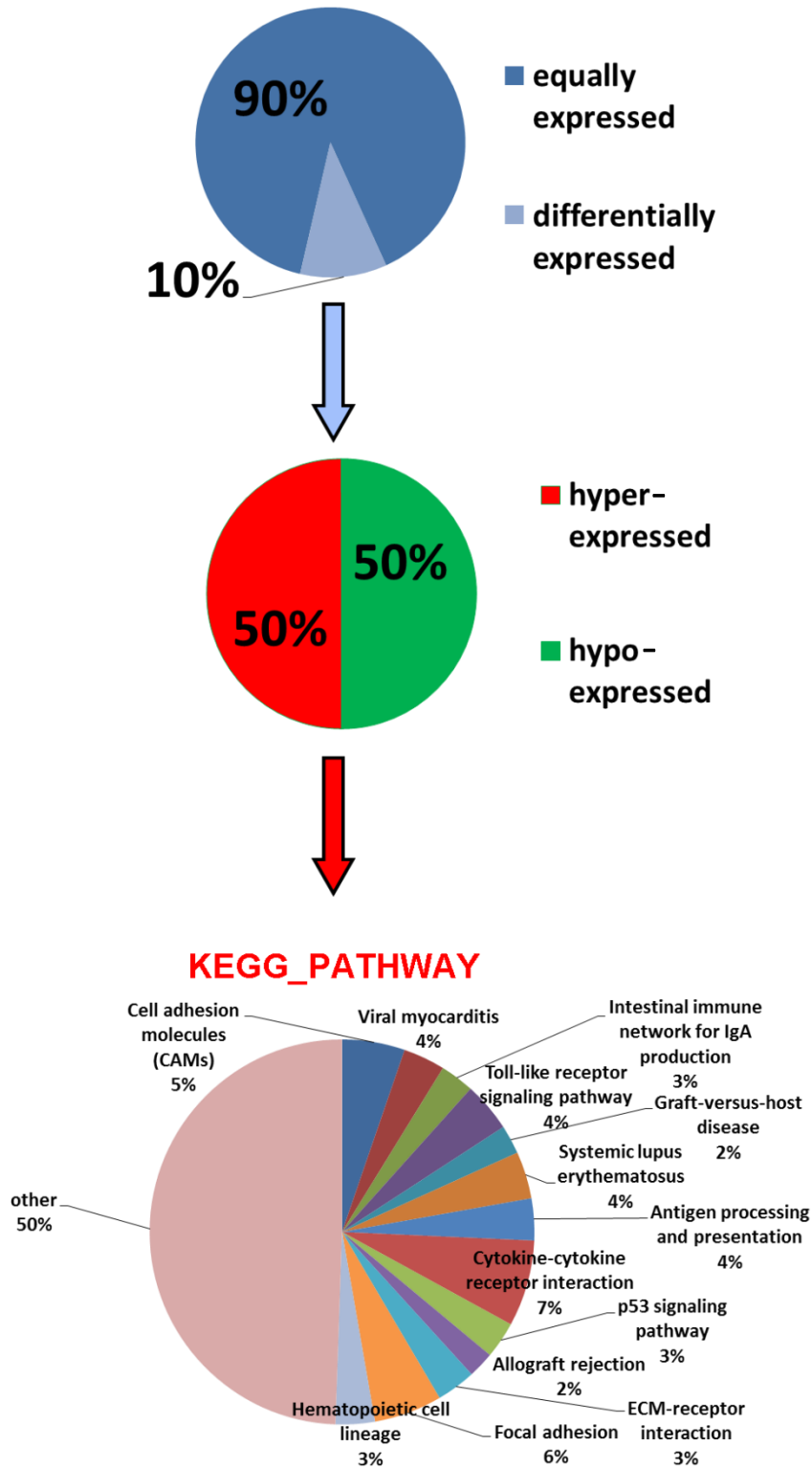


Fig. 4 検体 B の Exon array 解析.

C

Tumor vs Normal

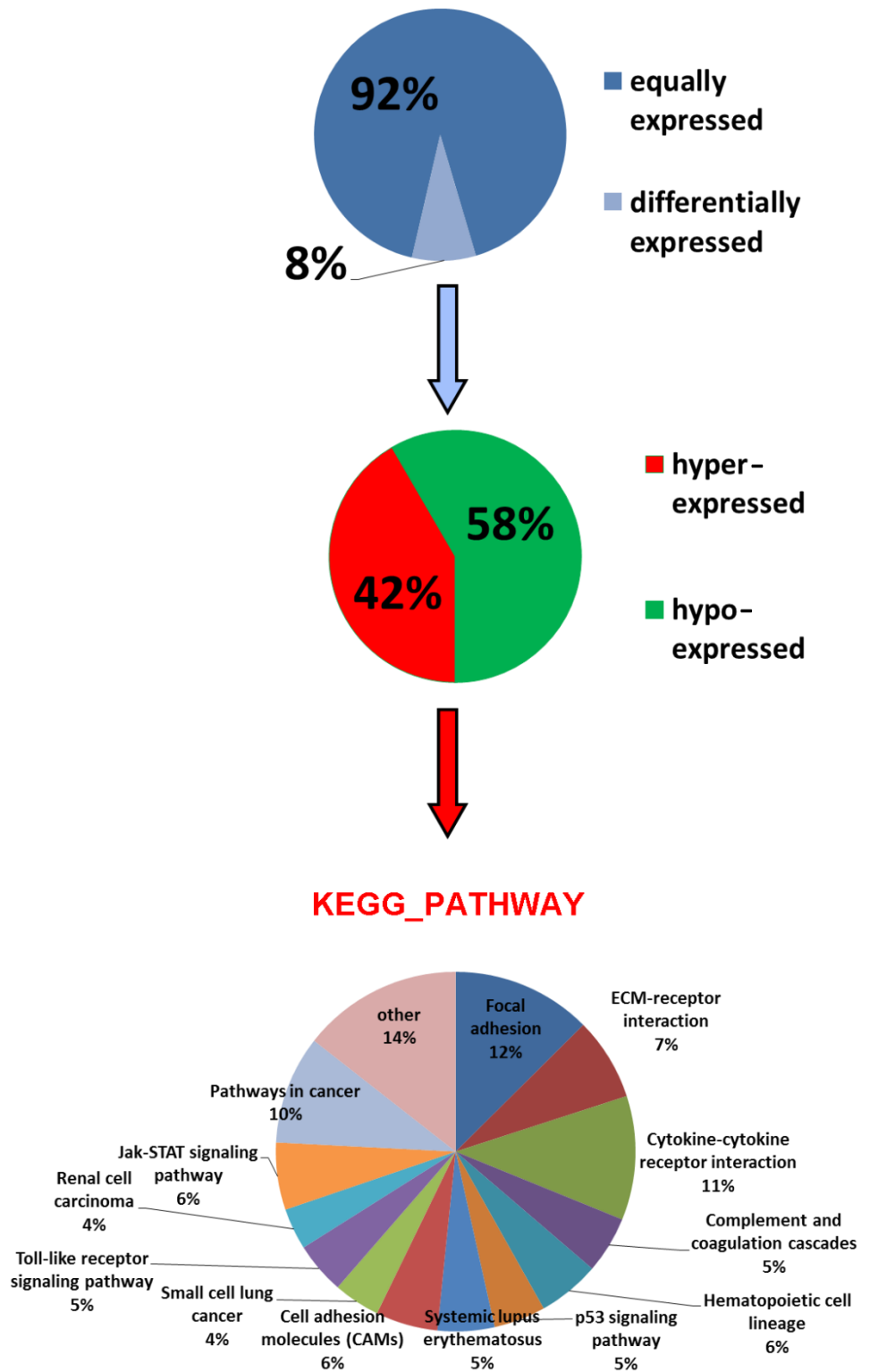
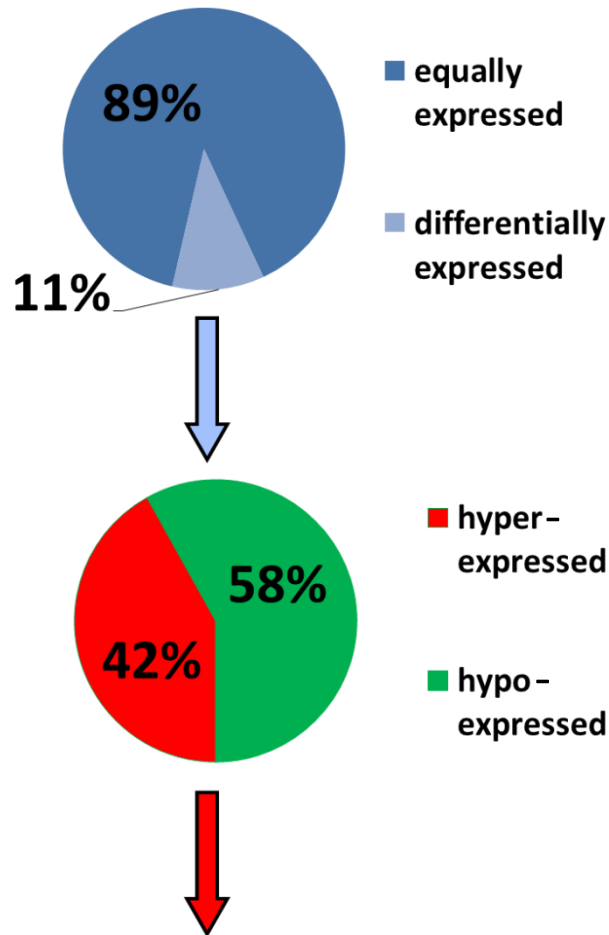


Fig. 5 検体 C の Exon array 解析.

D

Tumor vs Normal



KEGG_PATHWAY

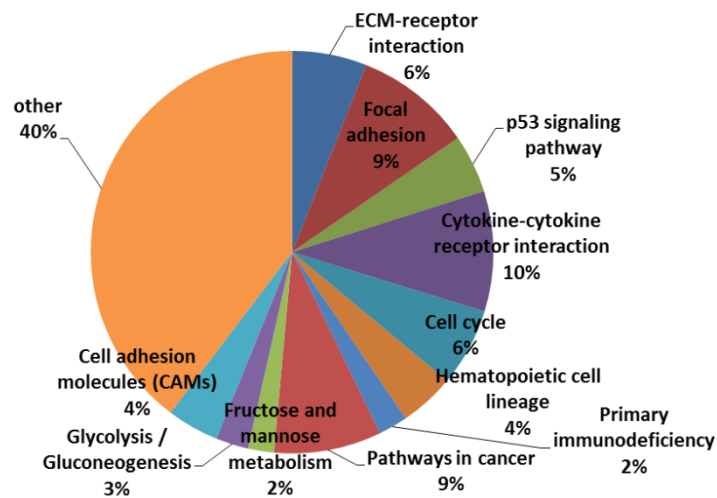


Fig. 6 検体 D の Exon array 解析.

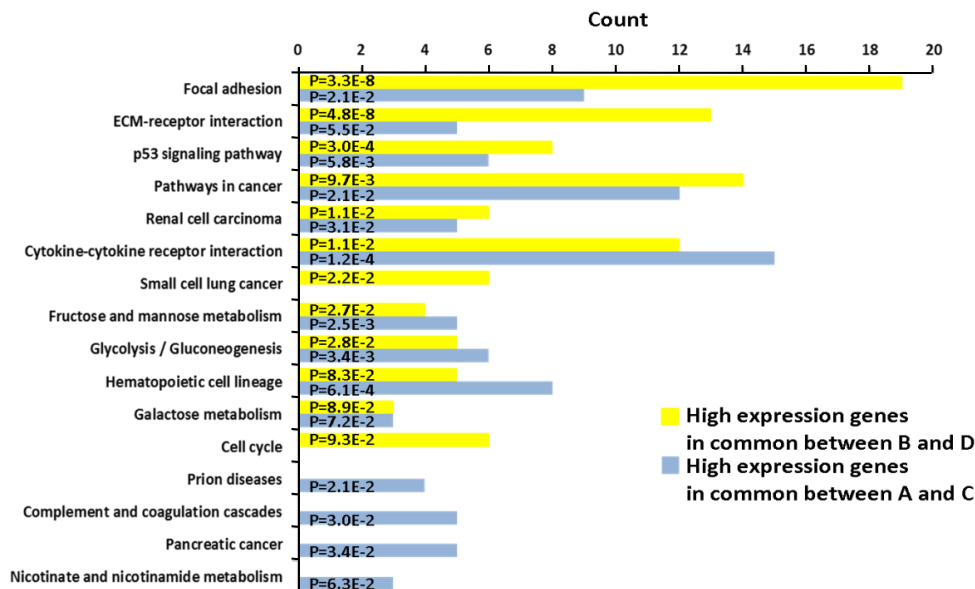


Fig. 7 手術後生存症例及び癌死症例に分けた、KEGG_PATHWAY 解析

ccRCC 臨床検体 4 組について予後をもとに 2 組に分け、それぞれ癌部で共通して発現亢進している遺伝子について KEGG_PATHWAY データベースを用いて分類し、各シグナル伝達経路に含まれる遺伝子数を count として表記した。

第 3 節 ccRCC 臨床検体を用いた DNA methylation array 解析

前節までと同様の ccRCC 臨床検体 4 ペアについて DNA methylation array 解析を行った。解析結果は DNA methylation 強度を示し 0 – 1.0 までの数字で表される β 値、及びばらつきを示す P 値が算出される。本検討においては非癌部・癌部のメチル化の差異を求める為に、非癌部と癌部の β 値の差が絶対値 0.2 以上で、非癌部・癌部いずれかにおいて $P > 0.01$ のプローブを除いたものを DNA methylation の有意な差を示すプローブ、つまりゲノム上で癌部と非癌部の DNA methylation の異なる領域であると定義を据えた。

臨床検体 A, B, C, D の非癌部・癌部ペアの β 値の差を算出しその絶対値が 0.2 以上を示したのはそれぞれ全体プローブ中 10% 前後であった。ただし、興味深いことに病期が T3 以上にあたる B, C, D の検体ペアではこの割合が増加する傾向が見られた。また、この変化の起きている領域が非癌部に比べ癌部で高メチル化状態にあるのか低メチル化状態にあるのかを解析したところ、臨床検体 D を除いては低メチル化状態にある領域が優勢である結果を得た (Fig. 9-12)。

また、各プローブにはゲノム上の領域を遺伝子転写開始領域 (transcription start site : TSS) や遺伝子コード領域内 (5' untranslated region : UTR, 1st exon, Gene body, 3' UTR) を示した Functional genomic distribution 及び、CpG island を軸にその付近を Shore, Shelf として示す CpG content and neighborhood context の二種類の annotation 情報が付加されている (Fig. 8)。これら annotation 情報を元に癌部において高メチル化或いは低メチル化を示したプローブの位置情報を円グラフにより表した。各検体の癌部で高メチル化状態にある領域は Functional genomic distribution の基準では Body の割合が、そして CpG content and neighborhood context の基準において island が多い結果となった。しかし検体間の結果を比較すると、T3 以上の検体 B, C, D では island 領域において T1 である検体 A より癌部でより高メチル化を示す傾向があった (Fig. 9-12)。

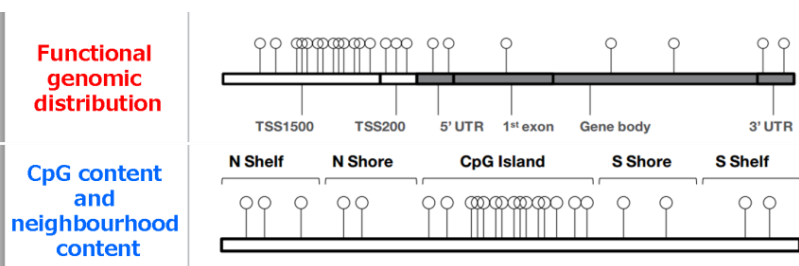


Fig. 8 DNA methylation array 解析における annotation 情報の模式図

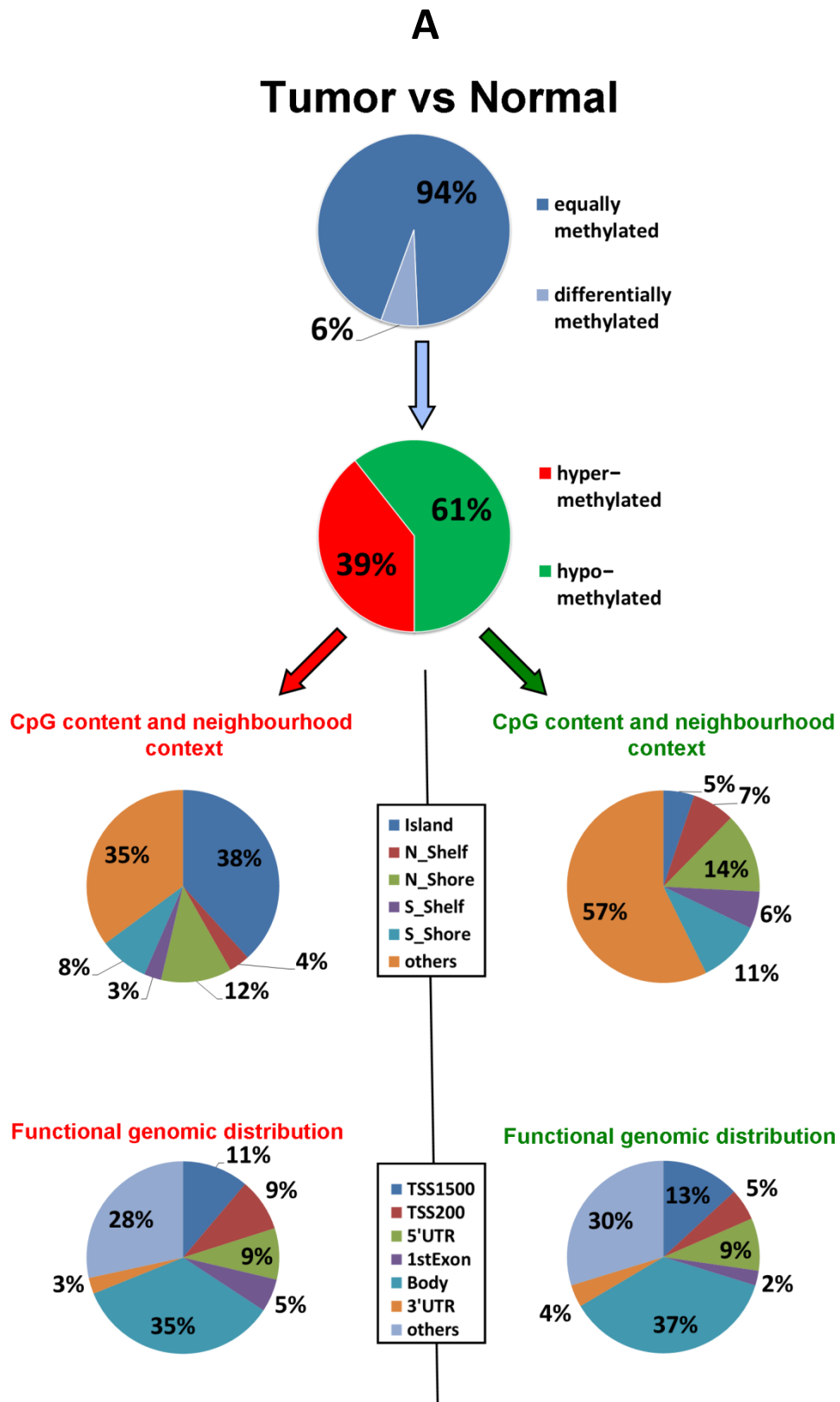


Fig. 9 検体 A の DNA methylation array 解析.

B Tumor vs Normal

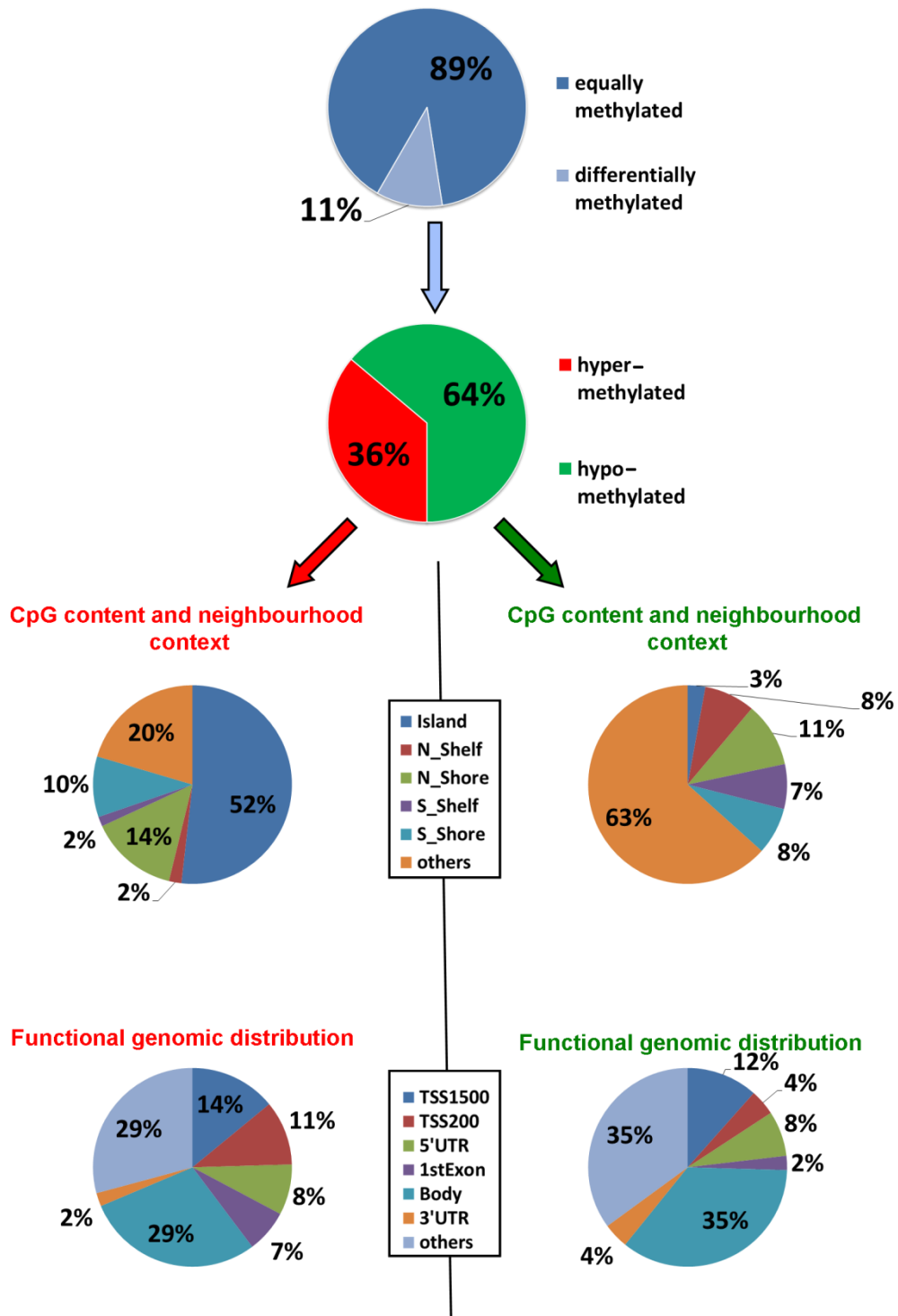


Fig. 10 検体 B の DNA methylation array 解析.

C Tumor vs Normal

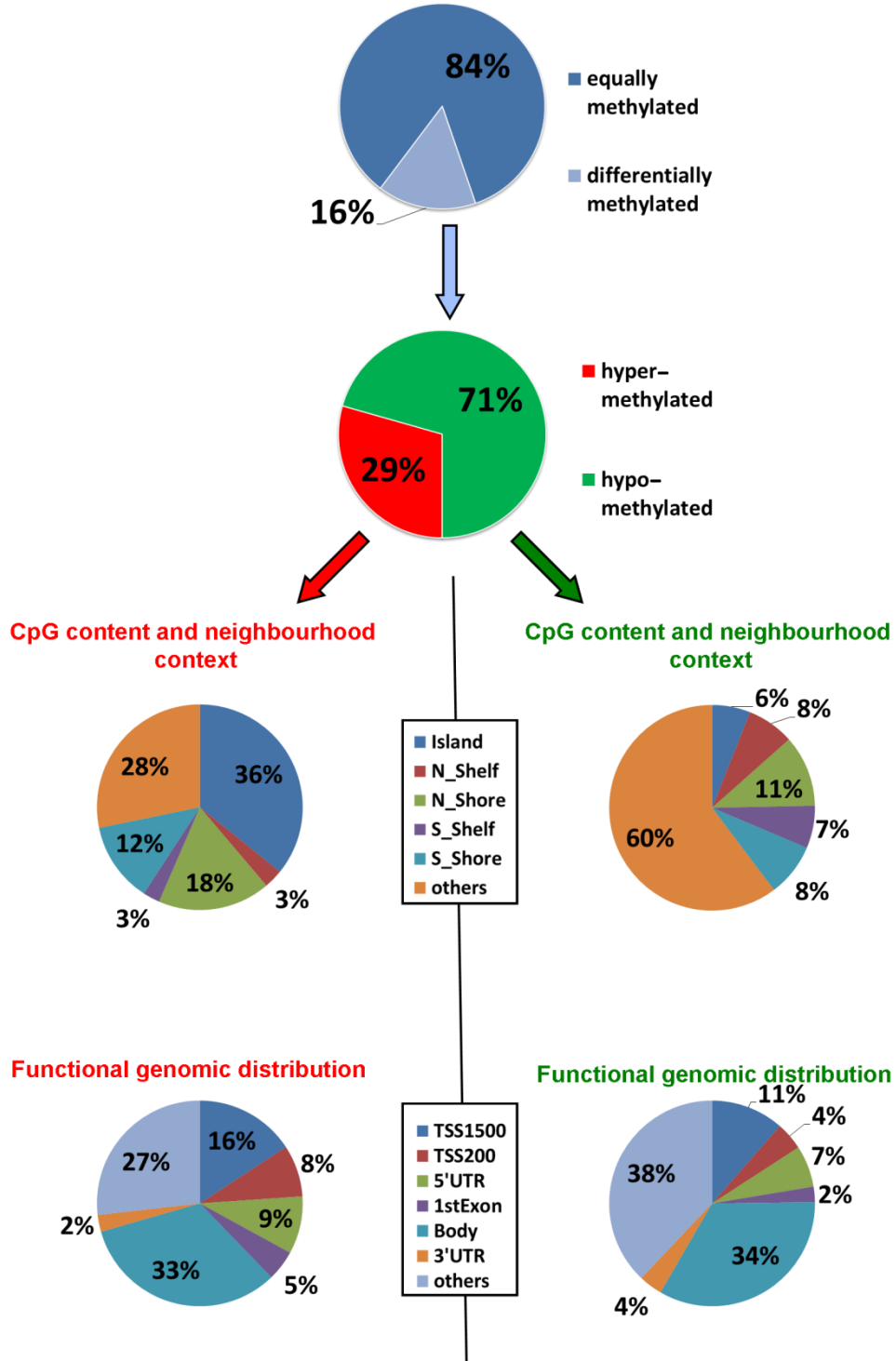


Fig. 11 検体 C の DNA methylation array 解析.

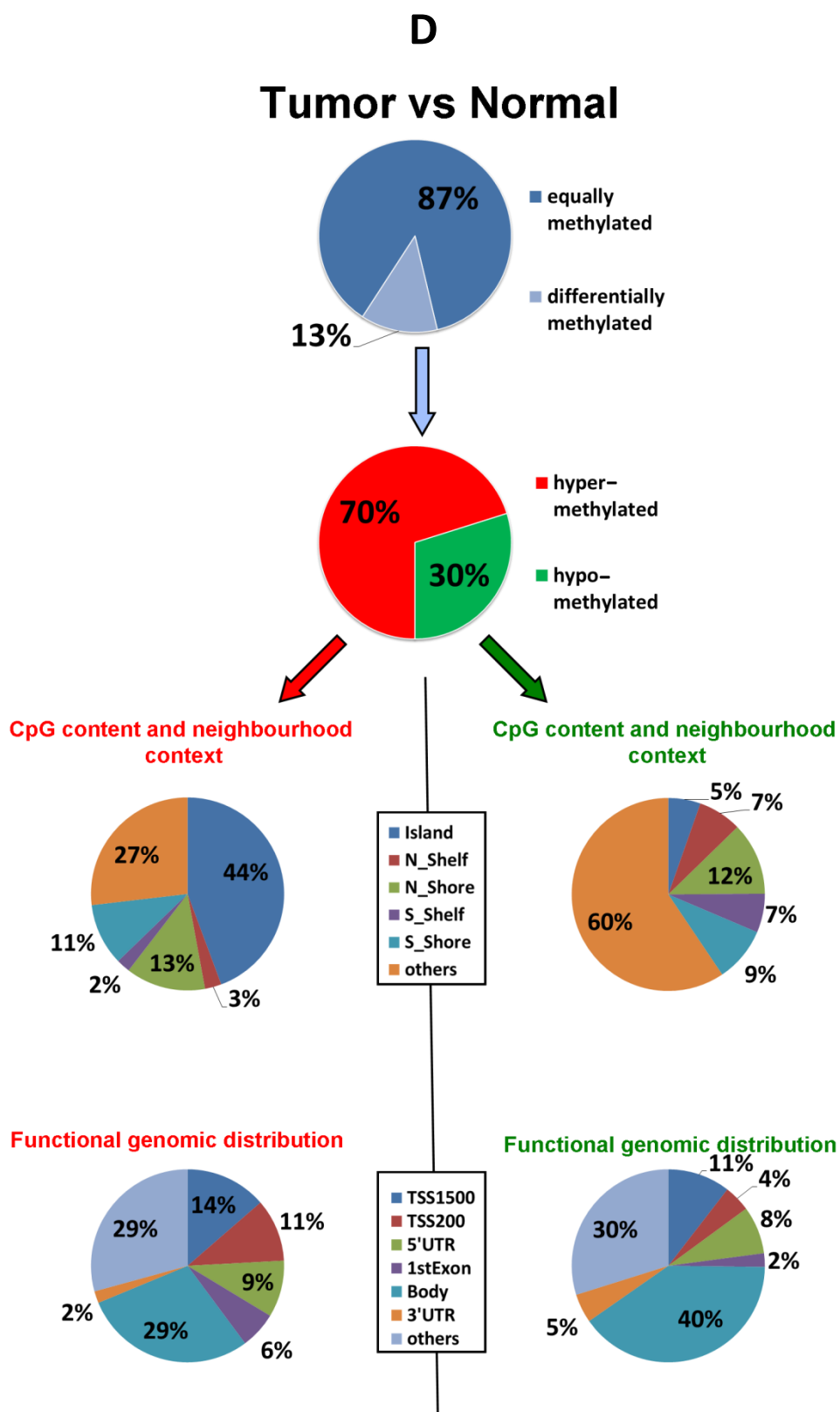


Fig. 12 検体 D の DNA methylation array 解析.

第4節 解析候補遺伝子 LOXL2 の抽出

Exon array, DNA methylation array から得られたデータを元に、以下の基準をもって解析候補遺伝子の抽出を行った。

- ・ 4 組共通して癌部で2 倍以上発現亢進がしている遺伝子。
- ・ 4 組共通で低メチル化を示す箇所がコード領域内に存在する遺伝子。
- ・ ccRCC における機能解析が行われていない遺伝子。

以上基準を満たす遺伝子としてLysyl oxidase like 2 (LOXL2) に着目した。

まず, LOXL2 について非癌部と癌部が揃っているccRCC 臨床検体31 組についてreal-time PCR で発現を確認すると、癌部における有意な増加が示された(Fig. 13)。またT 分類, Stage, Grade の異なる90 例のccRCC 癌部検体を追加しReal-time PCR を行うとLOXL2 mRNA 発現量が、原発巣の大きさ、そしてStage に相関する結果を得た (Fig. 14)。これらの結果より、LOXL2 がccRCC の腫瘍増大や浸潤転移に寄与することが示唆された。

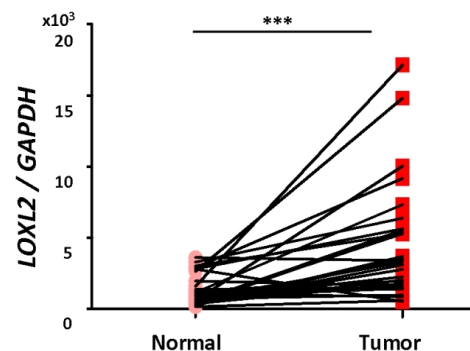


Fig. 13 ccRCC 臨床検体における非癌部に対する癌部での LOXL2 発現比較。実験には Table 2 A に示した 31 例の臨床検体を用いた。

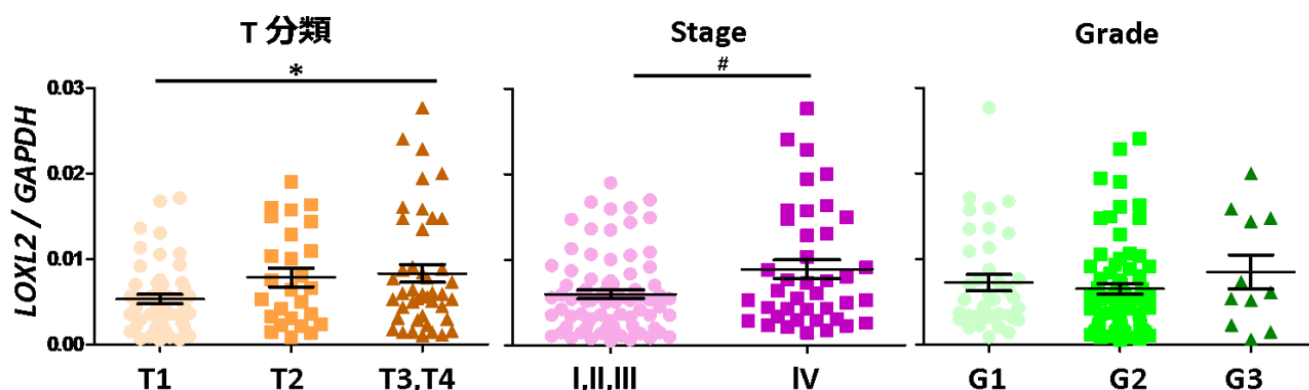


Fig. 14 ccRCC 臨床検体癌部を T 分類, Stage, Grade に分け, LOXL2 発現比較検討。

実験には Table 1,2 に示した癌部臨床検体 121 例を用いた。

Data show mean \pm S.D. * $P < 0.05$ T1 vs T3,T4 ; # $P < 0.05$ I,II,III vs IV.

また, DNA methylation array の結果より, 4 組のccRCC 検体で共通してLOXL2 コード領域の3' UTR において低メチル化がみられた(Fig. 15)。プロモーター領域におけるDNAメチル化が遺伝子発現に影響を及ぼすことは広く認識されている(6)。近年コード領域の3' UTR へのメチル化も遺伝子発現に影響を及ぼすという報告もなされている(7)。

しかしながら, その詳細な遺伝子発現調節機構はまだ明らかになっていないことから, LOXL2 遺伝子発現にこの3' UTRのメチル化がどの程度影響を及ぼしているのかは不明である

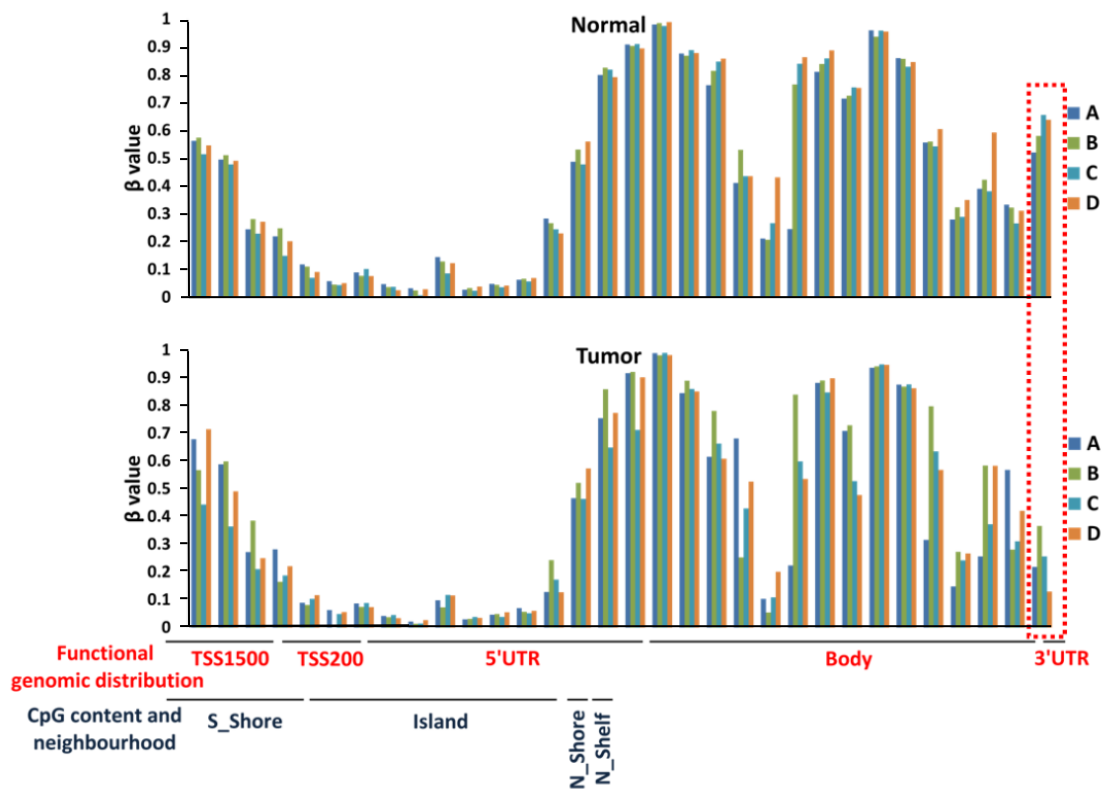


Fig. 15 LOXL2 遺伝子コード領域の DNA methylation array 解析.

第4節 小括

- ccRCC では、非癌部に比べ癌部で発現低下している遺伝子の割合が高い結果を得た。また、癌部で発現亢進している遺伝子についてPATHWAY 解析を行ったところ、予後不良の症例ではECM-receptor interaction と、focal adhesion シグナル伝達経路が重要であることが示唆された。
- ccRCC において、非癌部に比べ癌部でLOXL2 遺伝子は3' UTR 領域にて低メチル化を示していた。LOXL2 遺伝子発現と 3' UTR の低メチル化との因果関係は不明であるが、LOXL2 は癌部において高発現しており、またその発現は原発巣の大きさ、Stage に関連していることが明らかとなった。

第2章 LOXL2 発現抑制 ccRCC 細胞株の表現型解析

LOXL2 は Lysyl oxidase family に属し、その機能はコラーゲンとエラスチンの架橋反応を触媒することで ECM の再構成に寄与することが報告されている(8). PATHWAY 解析により ccRCC 予後不良検体で ECM-receptor interaction, focal adhesion シグナル伝達経路の重要性が示唆されたことから、LOXL2 がその酵素活性により両シグナルの活性化に寄与することで ccRCC 予後不良の要になっている可能性があると考えた。また、LOXL2 は細胞膜タンパク質 E-cadherin の発現を抑制する転写因子 snail の発現を安定化させる機能がある(9)。さらにはヒストン H3K4 の脱アミノ化反応を触媒することでエピジェネティクスに E-cadherin 発現を抑制するユニークな機能もあることが報告されている(10)。E-cadherin 発現低下は癌細胞が上皮系から間葉系の形質に転換する上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT) と相関性を示すことが知られている(11)。このことから LOXL2 の基質はコラーゲンやエラスチンのみではなく、様々な分子との相互作用を通じて癌の悪性化に関わっていると可能性がある。これらのことから、LOXL2 が ccRCC において癌促進的な機能を有しているものと推察し、ccRCC 細胞株を用いた *in vitro* での LOXL2 機能解析を行った。

第1節 実験材料と実験方法

細胞株

ccRCC 細胞株(786-O, ACHN, Caki1, Caki2) は大阪大学医学部泌尿器科からの譲渡を受けた。10% 濃度の FCS を添加した RPMI-1640 培地で培養した。

siRNA のトランスフェクション

786-O 細胞に small interfering RNA (siRNA) をトランスフェクションするには lipofectamin RNAi MAX (Invitrogen) を使用した。トランスフェクションは 12 well plate で行い、血清未添加の RPMI-1640 液体培地 260 μ L 中で終濃度 10 nM の siRNA と lipofectamin RNAi MAX 1.2 μ L を予めと反応させ 8×10^4 個の 786-O 細胞を総液量 500 μ L となるよう混合し CO₂ インキュベーター内にて培養、24 時間後に 10% 濃度の FCS を添加した RPMI-1640 培地に交換を行うか実験に使用した。また、12 well plate 以外の well plate 若しくは dish で実験を行う際には 12 well plate の底面積を参考に各試薬の使用量を比率で求め使用した。LOXL2 に対する siRNA は Sigma-Aldrich 社より購入した以下の配列のものを用いた。またネガティブコントロールとして B-Brige 社より購入した Control siRNA を使用した。

Control siRNA : auccgcgcgauaguacguaTT

LOXL2 siRNA #1 : gccacataggtggttcctcaTT

LOXL2 siRNA #2 : agtaaagaagcctgcgtggtcTT

Total RNA 抽出, cDNA 合成

ccRCC 細胞株からのTotal RNA 抽出にはTrizol reagent (Invitrogen) を用いた。
Total RNA 500 ng を用いて, PrimeScript RT reagent Kit (Takara) によりcDNA 合成後,
MiliQ 水 により10 倍希釈して実験に使用した.

Real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

第1章 第1節 の手順に従い実験した.

細胞免疫染色

siRNA トランスフェクション24 時間後の786-O 細胞を0.025% EDTA により剥離しカバーガラス上に再播種, さらに24 時間培養後, 免疫染色を行った.

PBS (Phosphate buffered saline) によるwash を3 回行った後, 0.1% Triton-X in PBS 5 分間処理して細胞膜を可溶化し, 5% スキムミルク(森永) in PBS で1 時間室温で反応させることでブロッキングを行った.

抗 β -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich), 抗 β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich), 抗 FAK 抗体 (Santacluz)はそれぞれPBS 中に1000倍希釈し用いた. また, 二次抗体としてAlexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Invitrogen), もしくはAlexa Fluor 568 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Invitrogen) をPBS 中に1000 倍希釈して1 時間反応させた. その後, PBS によるwash を3回行い蛍光顕微鏡にて観察した.

xCELLigence による細胞増殖解析

siRNA トランスフェクション24 時間後の786-O 細胞を0.025% EDTA 処理で剥離し, xCELLigence (Roche) 細胞増殖モニタリング用プレート(E-plate) に2000 細胞ずつ播種しモニタリングを開始した. 横軸はモニタリング開始後の時間を, 縦軸はインピーダンスを示すcell index を表示している.

Wound healing assay

siRNA トランスフェクション24 時間後の786-O 細胞を24 well plate に100% コンフルエントとなるよう再播種し24 時間培養後, チップの先でwell 底を引っ掻き傷(wound) を付けた. そして, 無血清RPMI-1640 に置換し12 時間の培養後, 顕微鏡下にて写真を撮影し, 傷面積をImage J により数値化することで定量した.

xCELLigence による細胞浸潤能解析

siRNA トランスフェクション24 時間後の786-O 細胞を0.025% EDTA 処理で剥離し, 予め20% のBD Matrigel Basement Membrane Matrix High Growth Factor Reduced (Becton, Dickinson and Company) でコートしておいたxCELLigence 細胞浸潤モニタリ

ング用プレート(CIM-plate) に20000 細胞ずつ播種しモニタリングを開始した.

FACS 解析

siRNA トランスフェクション48, 72, 96 時間後の786-O 細胞を0.025% EDTA 処理により剥離しPBS で希釈した冷70% エタノールで4 °C 一晩固定した. PBS で5 回のwash 後propidium iodide : PI (Sigma-Aldrich) を添加しメッシュを通してFACSCalibur (BD Biosciences) を用いて解析した.

Western blot

サンプルとなる細胞は冷PBS により2 回のwash 後, 2 x SDS sample buffer (1 M Tris-HCl 125 mM, グリセロール 20%, 2-メルカプトエタノール 10%, sodium dodecyl sulfate : SDS 5%, bromophenol blue : BPB 少量)により可溶化し, 26 G の注射針を複数回通すことでDNA を断片化し, 95 °C 5分間のdenature 処理を施し細胞lysate を調整した. このlysate を, 10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて, 20 mA の定電流下, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離した. 泳動後のゲルと polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜(Millipore) をtransfer buffer (192 mM glycine / 25 mM Tris / 20% methanol) で, それぞれ20 分振盪しながらインキュベートした. その後, ゲルとPVDF 膜を密着させ, transfer buffer 中でXCELL II Blot Module (Invitrogen) を用いて定電圧25 V で1 時間, 転写した.転写後, tris buffered saline-tween 20 (TBS-T ; 1 % Tween20 / 150 mM NaCl / 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)) で3 回wash し, 5% スキムミルクに浸し振盪しながら1 時間のブロッキング反応を行った. 続いて, Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) に希釈しておいた一次抗体と室温1 時間或いは4 °C で一晩反応させ, TBS-T による3 回のwash 後, Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 2 (TOYOBO) に希釈した二次抗体と室温1 時間の反応を行った. さらにTBS-T で3 回wash 後, ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて発光させ, LAS 4000 mini (GE Healthcare) にてバンドの撮影を行った.

抗LOXL2 抗体(Ambion) は1000 倍, 内部標準として用いた β -actin に対する抗 β -actin 抗体(Sigma-Aldrich) は10000 倍希釈して反応させた. また, 抗FAK 抗体(SantaCruz), 及び抗pFAK(Tyr516) 抗体(Sigma-Aldrich), 抗caspase-3 抗体, 抗caspase-8, 抗caspase-9, 抗PARP 抗体, 抗XIAP 抗体(以上いずれも Cell signaling technology),抗Bcl-2 抗体と抗Bcl-xl 抗体(Calbiochem), 抗cIAP2 (BD Biosciences), いずれも1000 倍希釈して用いた.

第2節 ccRCC 細胞株の LOXL2 発現解析及び siRNA によるノックダウン解析

まず, *in vitro* にて ccRCC における LOXL2 の機能を評価する為には用いる細胞株の選択を行った. 786-O, ACHN, Caki1, Caki2 細胞より Total RNA を抽出後 cDNA を合成し, Real-time PCR により LOXL2 の発現を解析すると, 786-O, Caki1 での発現が高く, Caki2 での発現が低い結果を得た (Fig. 16A). 786-O 細胞で最も LOXL2 の発現が高かったため, 以下の実験は 786-O 細胞を用いて行なった. まず, 配列の異なる 2 種類の LOXL2 に対する siRNA を用いてノックダウン効果を確認した, トランスフェクション 48 時間後に, Real-time PCR 及び Western blot による解析を行った. 結果, LOXL2 発現が mRNA 及びタンパク質レベルで十分に抑制されていた (Fig. 16B).

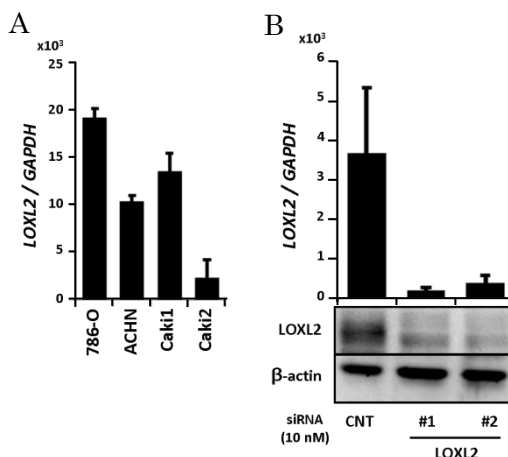
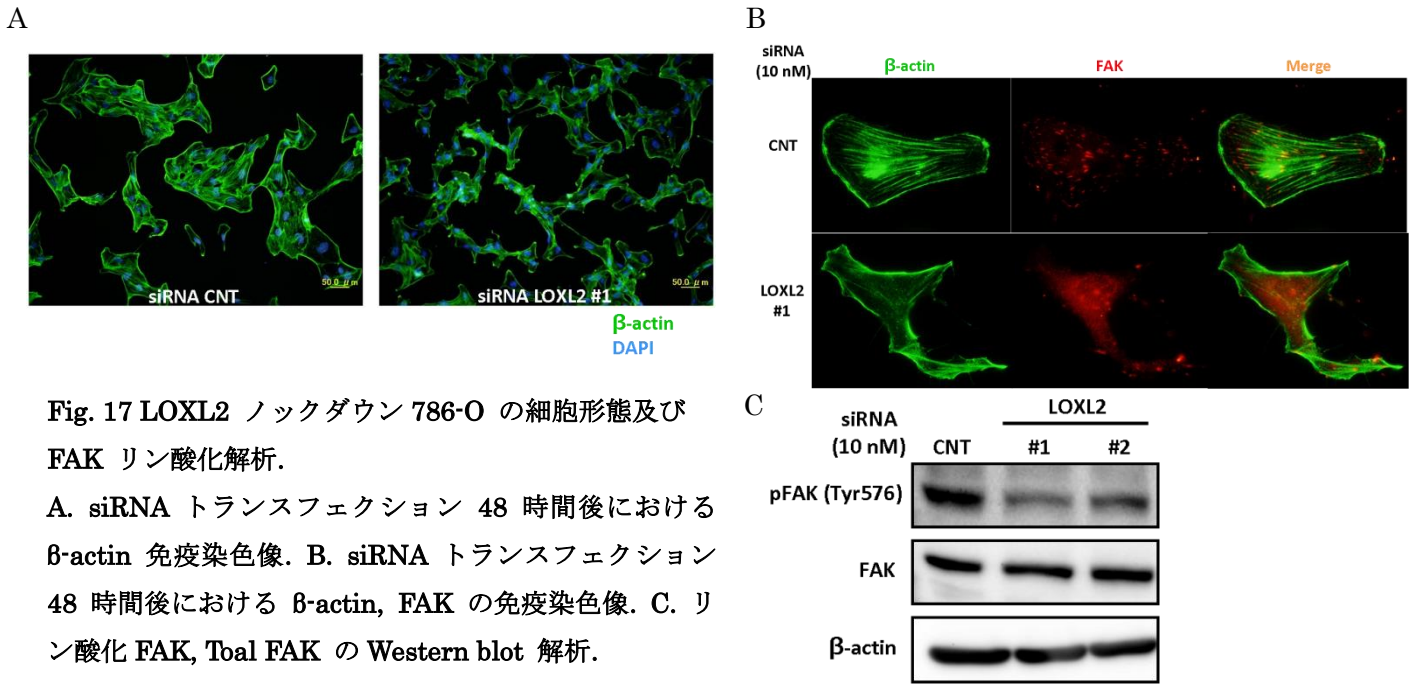


Fig. 16 ccRCC 細胞株における LOXL2 遺伝子発現とノックダウン効果の検討.
A. Real-time PCR による ccRCC 細胞株における LOXL2 遺伝子発現解析.
B. 786-O における siRNA トランスフェクション 48 時間後による LOXL2 ノックダウン効果. Real-time PCR(上). Western blot (下).
Data shown mean \pm S.D. (n=3).

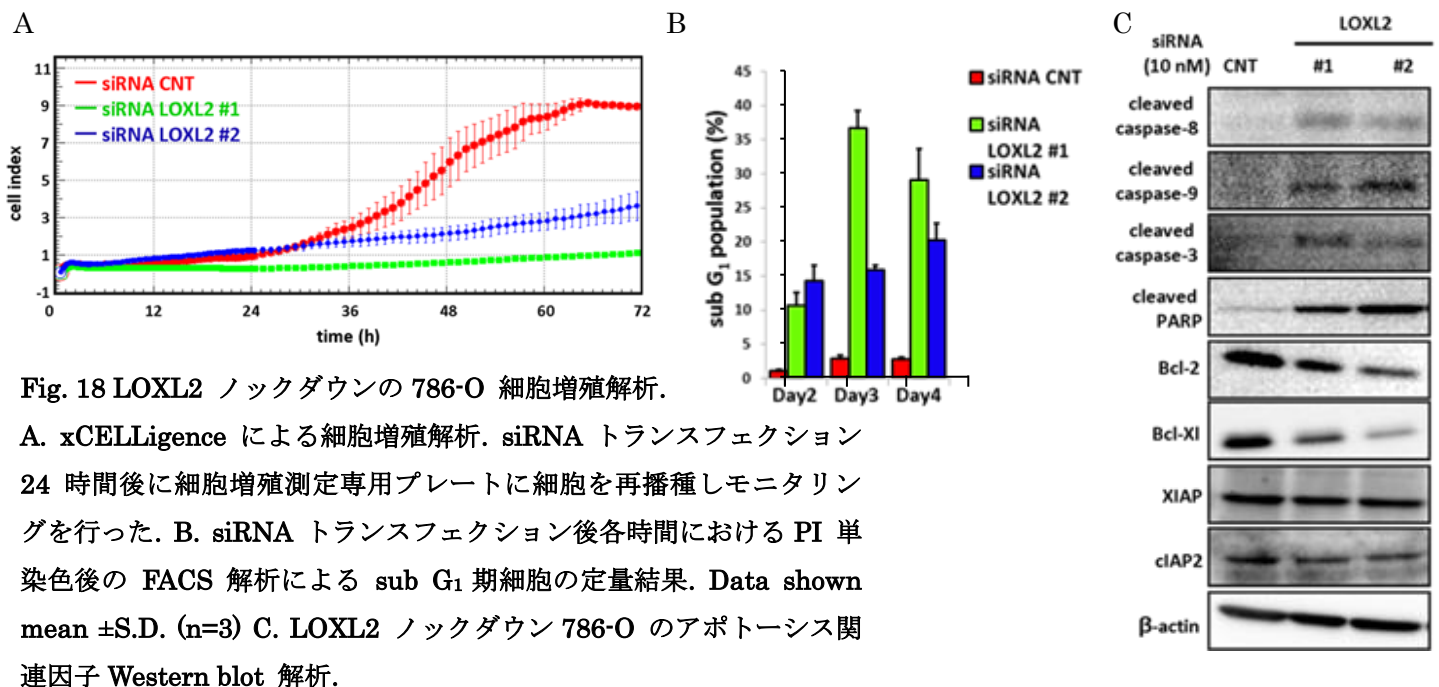
第3節 LOXL2 ノックダウン 786-O の細胞形態評価

LOXL2 siRNA をトランスフェクションした細胞の様子を顕微鏡下で観察すると細胞形態の変化が誘導されていた. そこで, 細胞骨格タンパク質である β -actin を免疫染色し, 蛍光顕微鏡にて観察した. その結果, コントロール細胞に比べ, LOXL2 ノックダウン細胞では, 細胞の伸展性が変化していた (Fig. 17A). また, 通常 β -actin は互いに重合することで細胞の伸展性を担うストレスファイバーを形成することが知られているが (11), LOXL2 ノックダウン細胞ではストレスファイバーの形成が減弱していた (Fig. 17B). ストレスファイバーの起点となるのは細胞が ECM と接着する際に機能する focal adhesion である (12). そこで, focal adhesion を構成し, ECM との接着を細胞内シグナル伝達に変換するチロシンキナーゼ Focal adhesion kinase (FAK) の免疫染色を同時に施した. その結果, コントロール細胞ストレスファイバーの先端で細い斑状に形成された focal adhesion が, LOXL2 ノックダウン細胞では減弱され細胞質内に分散している結果を得た (Fig. 17B). FAK の活性化には Tyr⁵⁷⁶ リン酸化が重要であることが報告されていることから (13), LOXL2 ノックダウンが FAK の活性状態に及ぼす影響を Western blot にて検討した. その結果 LOXL2 ノックダウンにより, Tyr⁵⁷⁶ リン酸化レベルが低下し, FAK の活性低下が起こっていることが示唆された (Fig. 17C).



第4節 LOXL2ノックダウン786-O の増殖性解析

これまでにLOXL2 をノックダウンすることによりfocal adhesion の形成が抑制され、FAK の活性化低下が起こっていることが示唆された. FAK はECM から細胞外シグナルを細胞形態や生存・増殖シグナルへと変換することが知られていることから(5), LOXL2 がFAK を介して細胞形態や生存・増殖に影響を及ぼしていることが考えられた. そこでまず、LOXL2 ノックダウンが細胞増殖に与える影響をリアルタイムに細胞増殖がモニタリングできる装置であるxCELLigence とその専用プレートを用いて検討した. その結果、コントロール細胞に比べLOXL2ノックダウン細胞では、著しい増殖抑制がみられた(Fig. 18A). このLOXL2 ノックダウンによる影響が、細胞周期の停滞或いは細胞死のどちらに起因するかをPI 単染色後FACS 解析によって評価した. その結果、sub G₁ 期にある細胞の上昇がLOXL2 ノックダウン細胞で確認された(Fig. 18B). アポトーシス関連分子発現を Western blot にて確認すると、アポトーシス誘導分子であるカスパーゼ3, 8, 9 の活性上昇



やアポトーシス抑制的に働く Bcl family 分子の発現抑制が, LOXL2 ノックダウンにて確認された. これら結果より, LOXL2 ノックダウンはアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制したことが示唆された(Fig. 18C).

第5節 LOXL2 ノックダウン 786-O 細胞の遊走能・浸潤能解析

次にLOXL2ノックダウンが細胞遊走能に与える影響をWound healing assayにて検討した. その結果, LOXL2 ノックダウンにより細胞遊走能がコントロール細胞に比べて有意に低下することが分かった(Fig. 19A). また, 細胞遊走能と密接に関わり, 癌の浸潤や転移能獲得に重要な機能である浸潤能をマトリゲルコートした浸潤能測定専用プレートを用いてxCELLigenceにて解析した. その結果, LOXL2ノックダウンによって浸潤能も低下することが分かった(Fig. 19B).

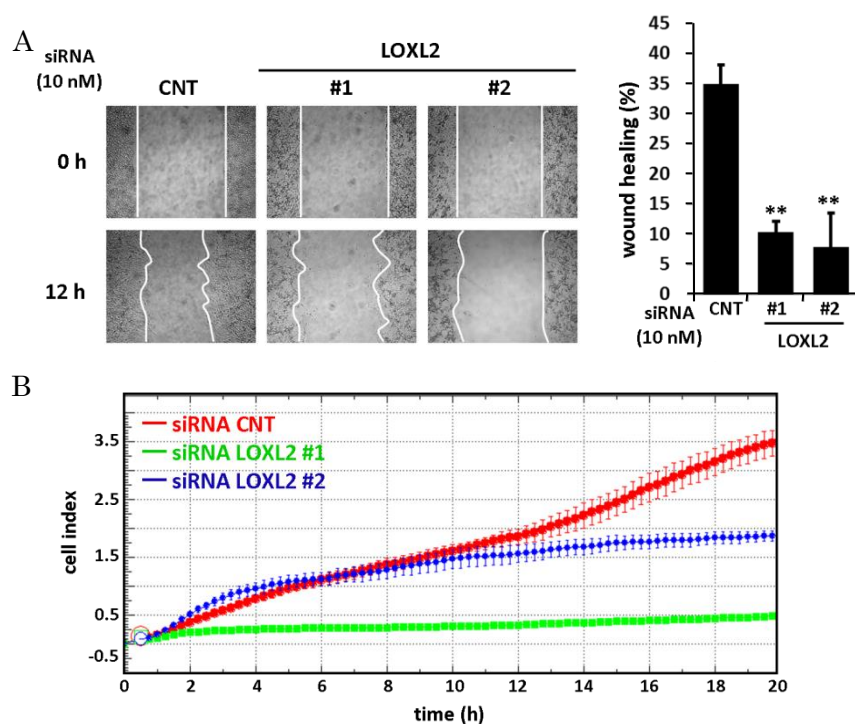


Fig. 19 LOXL2 ノックダウン 786-O 細胞の際における遊走能・浸潤能評価
siRNA トランスフェクション 48 時間後 (time 0) から測定を開始した.

A. Wound healing assay

Data shown mean \pm S.D.

**P<0.01 vs CNT (n=3).

B. Invasion assay.

第6節 小活

- 786-O 細胞におけるLOXL2 ノックダウン実験より, 細胞形態変化, 特に細胞伸展性が顕著に変化していた.
- LOXL2 ノックダウンにより786-O 細胞の増殖能が低下した. また, その細胞数の低下はLOXL2 ノックダウンによって誘導されるアポトーシスに起因することが示唆された.
- LOXL2 ノックダウンにより遊走能, マトリゲルへの浸潤能が低下した.

第3章 ccRCC 細胞株における LOXL2 によるインテグリン機能調節機構

これまでの結果より、LOXL2 ノックダウンによる focal adhesion の形成不全が細胞形態、細胞増殖能、細胞遊走能や細胞浸潤能に影響を及していると考えた。そこで、focal adhesion のコアであるインテグリンへの LOXL2 の関与を解析した。

第1節 実験材料と実験方法

Real-time PCR, Western blot

第1章 第1節及び第2章 第1節に記した手順に従って行った。

Real-time PCR には以下のプライマーを用い、

ITGA5

Forward: 5'- GGCAGCTATGGCGTCCCCTGTGG- 3'

Reverse: 5'- GGCATCAGAGGTGGCTGGAGGCTT- 3'

CHOP

Forward: 5'- CAGAACCAGCAGAGGTCACA- 3'

Reverse: 5'- AGCTGTGCCACTTTCCTTTC-3'

ASNS

Forward: 5'- ATCACTGTCTGGGATGAACCC- 3'

Reverse: 5'- CTTCAACAGAGTGGCAGCAA- 3'

GRP78

Forward: 5'- GGTGATTATCAGAAGCTGTAG- 3'

Reverse: 5'- CGTATGGTGCTGCTGTCCAGG- 3'

95 °C 30 秒 → 94 °C 15 秒, 62 °C 10 秒, 72 °C 15 秒を50 サイクル→ 72 °C 15 秒 → 40 °C 30 秒の条件で反応を行った。

Western blot には以下の抗体を使用した。抗ITGa5 抗体, 抗ITGβ1 抗体は Santa Cruz Biotechnology 社から購入した。抗ITGa2 抗体, 抗ITGa3 抗体, 抗ITGaV 抗体, 抗ITGβ3 抗体は BD Biosciences社から購入した。抗Ero1La 抗体は Abnova 社から購入した。抗体はそれぞれ 1000 倍希釈して使用した。

siRNA のトランスフェクション

第1章 第1節と同様の手技にて siRNA のトランスフェクションを行った。また、インテグリンα5 に対する siRNA は Sigma Aldrich 社より購入した以下の配列の siRNA を用いた。

ITGA5 siRNA : gagcagat tgcagaatct tatTT

Cell adhesion assay

実験前に予め Sumilon ELISA plate にフィブロネクチン 5 ng/ml となるよう PBS で希釈

した溶液を50 μ L ずつ分注し4 $^{\circ}$ C で一晩置く事によりplate 底面をコートしておく. そこに, siRNA トランスフェクション48 時間後の786-O 細胞を5000 個播種し, 30 分間CO₂ インキュベータ内で培養する. その後0.1% のBSA を含むRPMI-1640 で3 回wash し, calcein AM (同仁化学研究所) を1 μ g/ml 含むPBS で30 分間CO₂ インキュベータ内で培養, その後Envison (PerkinElmer) により495 nm 波長の蛍光強度を測定した.

WST-1 assay

siRNA トランスフェクション24 時間後96 well plate に2000 細胞ずつ細胞を播種し24 時間後, 48 時間後, 96 時間後に 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium salt (WST-1) / 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 溶液 : 1-methoxy-5-methylphenazinium (PMS) 溶液 を9 : 1 に混合し, 5% となるよう細胞培養液に添加2 時間後にEnvison (PerkinElmer)を用いて450 nm で吸光度を測定した. また, 対照波長として 630 nm の吸光度を測定した.

Cell surface biotinylation

siRNA トランスフェクション24 時間, 後氷上にてPBS で希釈したEZ-LINK Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo) 0.2 mg/ml と30 分反応させ細胞膜タンパク質をビオチン化した. そして, PBS でwash 直後にlysis buffer (50 mM Tris-Hcl pH7.5, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100) で溶解する, 若しくは各時間RPMI-1640 10% FCS 培地で培養した後にlysis buffer で溶解し一部を総タンパク質(whole cell lysate : WCL) として保存. 残りをstreptavidin ビーズ(Invitrogen) と一晩4 $^{\circ}$ C ローテーターを用いて反応させビオチン化した膜タンパク質を吸着させた. その後, lysis buffer で三回wash, 2 x SDS sample buffer を混合し95 $^{\circ}$ C 5 分間加熱しサンプルとした.

LOXL2 強制発現vector の構築

786-O 細胞由来Total cDNA をテンプレートにし, 下記プライマーと KOD FX (Toyobo) を用いてPCR を行いLOXL2 の全長をクローニングした.

Forward: 5'- CACCATGGAGAGGCCTCTGTGCTCCCACC -3'

Reverse: 5'- TTACTGCGGGGACAGCTGGTTG -3'

PCR 産物を電気泳動後, バンドを切り出し, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した. その後, pENTR/D-TOPO cloning kit (Invitrogen) を用いてLOXL2 cDNA をクローニングし(pENTR/D-TOPO/LOXL2), *E.coli* TOP10 (Invitrogen) を用いて形質転換した. そして, Luria-Bertani (LB) (kanamycin) plate で37 $^{\circ}$ C, 一晩培養した後, LB (kanamycin) 培地中で18 時間培養し, Wizard Miniprep kit (Promega) を用いて, プラスミドを精製した. 続いて, pENTR/D-TOPO/LOXL2 をentry clone, pDEST26

をdestination clone としてGateway LR clonase Enzyme Mix (Invitrogen) を用いて、プラスミドの組み換えを行った。その後、*E.coli* DH5 α を用いて形質転換し、LB (ampicillin) で培養後、Wizard Miniprep kit (Promega) を用いて、プラスミドを精製した。

LOXL2強制発現vector のトランスフェクション

実験にはHEK 293T 細胞を用いた。トランスフェクション24 時間前に48 well plate に20000 細胞となるよう播種しておき、Hilly MAX (Wako) を1.2 μ L とpDEST26 プラスミド200 μ g を無血清DMEM 20 μ L 中に混合し、20 分室温でインキュベートした後、細胞培養液に添加した。さらに、4 時間CO₂ インキュベータ内で培養後DMEM 10% FCS に交換し、48 時間培養後実験に使用した。

第2節 ccRCC におけるインテグリン発現パターン

focal adhesion はECM の受容体として機能するインテグリンをコアに形成され、インテグリンは α サブユニットと β サブユニットの2 種類のヘテロダイマーで機能することが知られている。 α サブユニットは8 種類、 β サブユニットは18 種類存在しており、それぞれの組み合わせにより認識するECM の種類が異なってくる(14)。そこで、ccRCC でどのインテグリンに着目すべきかExon array データを参照し、癌部で高発現しているインテグリンの探索を行った。

すると、ccRCC 4 検体共通してインテグリン $\alpha 5$ が癌部において高発現していた (Fig. 20A)。また、Real-time PCR によるバリデーション解析を行うと、LOXL2 とインテグリン $\alpha 5$ 発現に正の相関性のある傾向がみられた (Fig. 20B)。

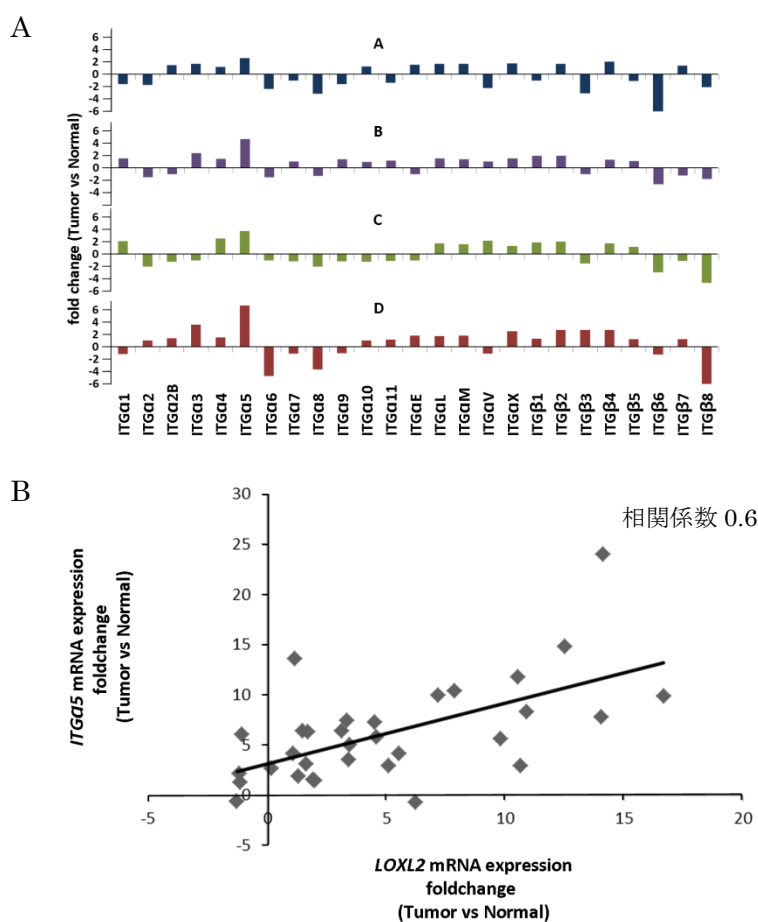


Fig. 20 ccRCC 臨床検体におけるインテグリン発現。

A. Exon array によるインテグリン family の癌部発現比較。

B. Real-time PCR によるインテグリン $\alpha 5$, LOXL2 癌部発現の相関性検討。

実験には Table 2A に示した ccRCC 検体を用いた。

第3節 LOXL2 がインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現に及ぼす影響

ccRCC 臨床検体においてLOXL2 とインテグリン $\alpha 5$ 間に発現の相関性が示唆されたことより, LOXL2 を発現しているccRCC 細胞はインテグリン $\alpha 5$ の発現を保持している可能性が考えられる. そこで, 786-O 細胞を用いてLOXL2 ノックダウン時におけるインテグリン $\alpha 5$ の発現を mRNA 及びタンパク質レベルで解析した. 結果, LOXL2 ノックダウンによりmRNA レベルでは有意な差は生じていなかったが, タンパク質レベルでの顕著な発現低下を認めた (Fig. 21A, B). また, インテグリン $\alpha 5$ とヘテロダイマーとして機能するインテグリン $\beta 1$ についてもその発現を解析すると, インテグリン $\beta 1$ もインテグリン $\alpha 5$ と同様にタンパク質レベルでの低下が認められた (Fig. 21C, D).

次に, LOXL2を強制発現させた際のインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現に及ぼす影響を解析するために, 腎臓由来細胞株であるHEK 293T 細胞を用いて検討を行った. LOXL2 過剰発現ベクターをHEK 293T に導入した48 時間後の細胞においてWestern blot を行ったところ, インテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現増加が確認された (Fig. 21E).

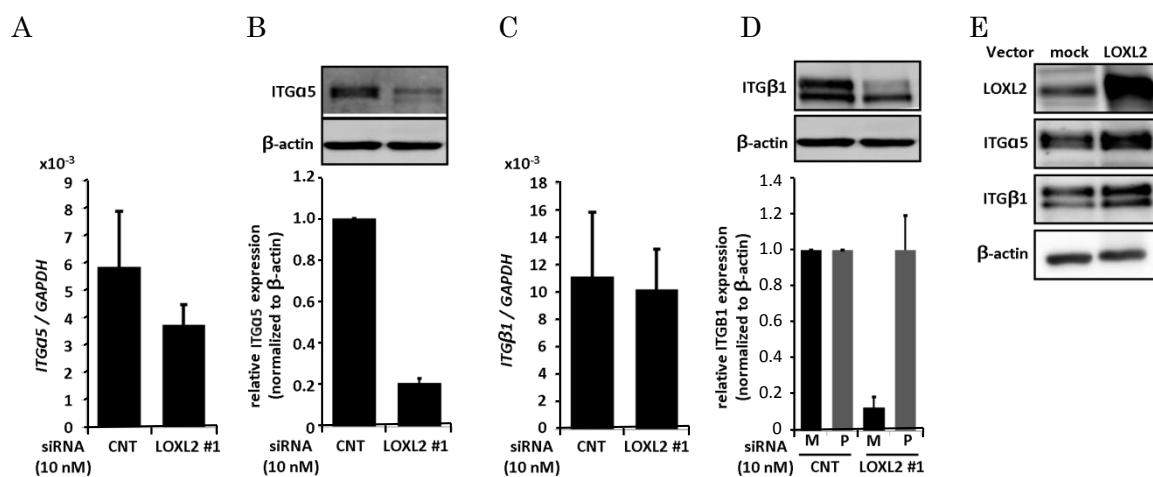


Fig. 21 LOXL2 ノックダウン, 強制発現がインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ 発現に及ぼす影響. **A.** LOXL2 ノックダウン 786-O におけるインテグリン $\alpha 5$ の Real-time PCR. Data show mean \pm S.D. (n=3). **B.** LOXL2 ノックダウン 786-O におけるインテグリン $\alpha 5$ の Western blot 及び image J によるバンド強度定量結果. Data show mean \pm S.E. (n=3). **C.** LOXL2 ノックダウン 786-O におけるインテグリン $\beta 1$ の Real-time PCR. Data show mean \pm S.D. (n=3). **D.** LOXL2 ノックダウン 786-O におけるインテグリン $\beta 1$ の Western blot. インテグリン $\beta 1$ はバンドが二本確認されるが下のバンドは Pre-mature (P) なもの, 上のバンドは Mature (M) なものを表す. Data show mean \pm S.E. (n=3). **E.** LOXL2 強制発現 HEK 293T 細胞におけるインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ 発現.

第4節 LOXL2, インテグリン $\alpha 5$ ノックダウン786-O のフィブロネクチン接着性

インテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ はヘテロダイマーを形成し、フィブロネクチンと相互作用することにより、細胞運動、増殖シグナルへ影響を及ぼすことが報告されている(15). よって、LOXL2 ノックダウンによりインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現が低下したことから、フィブロネクチンへの接着性低下が予想される. そこで、siRNA を用いてインテグリン $\alpha 5$ をノックダウンし(Fig. 22A), LOXL2 をノックダウンした際のフィブロネクチンへの接着性を検討した. LOXL2 をノックダウンすることにより有意に接着性が低下した. またその接着性の低下は、インテグリン $\alpha 5$ をノックダウンした時とほぼ同程度であったことから、LOXL2 ノックダウンによる接着性の低下は、インテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現低下に起因する可能性が示唆された (Fig. 22B).

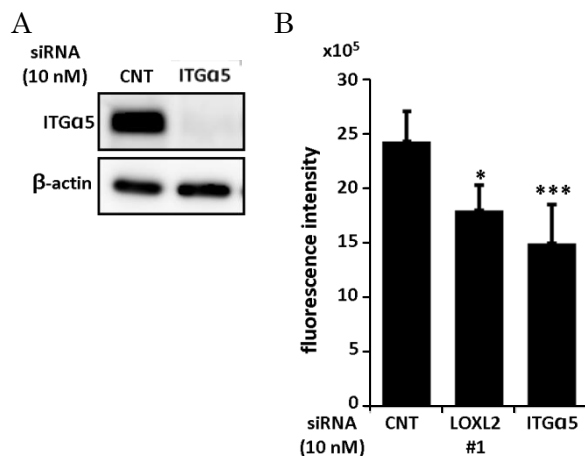


Fig. 22 A. 786-O 細胞に siRNA をトランスフェクションし 48 時間後におけるインテグリン $\alpha 5$ の Western blot. B. LOXL2, インテグリン $\alpha 5$ ノックダウン 786-O におけるフィブロネクチンへの接着性検討. Data show mean \pm S.D. * $P < 0.05$; *** $P < 0.01$ vs CNT (n=5).

第5節 LOXL2 ノックダウンが他のインテグリン family 発現に及ぼす影響

これまでに、LOXL2 ノックダウンによりインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ がタンパク質レベルで抑制されることが明らかとなったが、他のインテグリンファミリーに対するLOXL2 の影響をWestern blot により解析した. LOXL2 ノックダウンによりインテグリン $\alpha 2$, $\alpha 3$ タンパク質量は顕著な変化を認めなかったが、インテグリン αV , $\beta 3$ タンパク質量は顕著な低下を示した (Fig. 23). これらの結果より、LOXL2 はインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ だけでなく、インテグリン αV , $\beta 3$ の発現にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

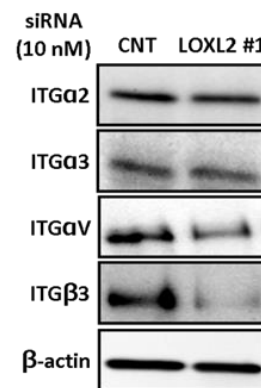


Fig. 23 LOXL2 ノックダウン 786-O 細胞のインテグリン $\alpha 2$, $\alpha 3$, αV , $\beta 3$ Western blot 解析.

第6節 インテグリンα5 ノックダウンによる786-O 表現型解析

786-O 細胞を用いた検討で LOXL2 が複数種のインテグリンタンパク質量に影響を及ぼすことが明らかとなった。一方, ccRCC 臨床検体ではインテグリンα5 の発現が顕著でありインテグリンα5 は各種癌にて癌促進的に働いていると報告されていることから(14,16), LOXL2 ノックダウンにより見られた表現型がインテグリンα5 発現低下に基づいていると考えた。そこで, インテグリンα5 ノックダウン実験を行い, LOXL2 ノックダウンと同様の表現型 (細胞形態変化、focal adhesion 形成、細胞増殖、細胞遊走能)を示すか検討した。その結果, インテグリンα5 ノックダウンにより LOXL2 ノックダウン時と同様に, ストレスファイバーの形成や focal adhesion の形成不全がみられた (Fig. 24A)。また, インテグリンα5 ノックダウンにより細胞増殖に対して影響は見られなかったが, 遊走能はコントロールと比較し有意な低下を示した (Fig. 24BC)。これらの結果より, LOXL2 ノックダウン時に見られた表現型のうち, 細胞形態や運動能についてはインテグリンα5 を介している可能性が示唆された。

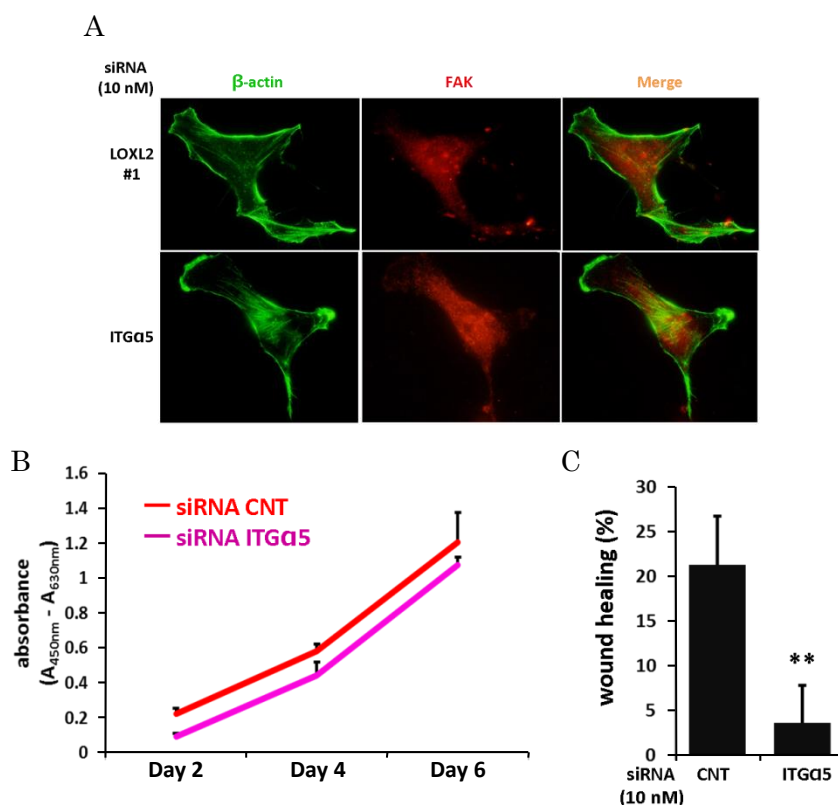


Fig. 24 インテグリン α5 ノックダウン 786-O の表現型解析.

A. LOXL2, インテグリン α5 ノックダウン 786-O の β-actin, FAK 免疫染色像の比較.

B. WST-1 assay によるインテグリン α5 ノックダウン 786-O の細胞増殖解析.

C. Wound healing assay によるインテグリン α5 ノックダウン 786-O の遊走能解析.

Data show mean ±S.D. **P<0.01 vs CNT (n=3)

第7節 LOXL2 ノックダウンによるインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ 発現調節機構

これまでに LOXL2 が複数種のインテグリンタンパク質量を制御していることが明らかとなったが、その詳細なメカニズムについては明らかとなっていない。そこで、インテグリン family の中でも ccRCC 臨床検体で高発現が確認されたインテグリン $\alpha 5$ 及びこれとヘテロダイマーで機能するインテグリン $\beta 1$ に注目し、LOXL2 によるインテグリン発現制御メカニズムを検討した。

インテグリンはリボソームにて翻訳された後に小胞体で糖鎖修飾、及びタンパク質のフォールディングを受ける。その後ゴルジ体へ輸送され、糖鎖修飾を受けることで成熟した形態となり、細胞膜上で ECM と接着する機能を発揮する。その後インテグリンは、細胞内へとエンドサイトーシスされエンドソーム内に取り込まれるが、再び細胞膜上へと再輸送されリサイクルされる。また一部はリソソームへ輸送されプロテアーゼによる分解を受ける(17,18,19)。このような細胞内動態を示すインテグリンに対して LOXL2 が影響を及ぼしているのではないかと考えた。

そこでまず、膜タンパク質をビオチン化することにより、LOXL2 ノックダウンが膜に表在するインテグリンタンパク質量に与える影響を検討した。トランスフェクション24 時間後において、全タンパク質区画のインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ タンパク質量は LOXL2 ノックダウンにより低下したが、膜区画のインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ タンパク質量は特に影響を受けなかった (Fig. 25A)。また、同様の検討をインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の基質であるフィブロネクチン上で行っても、同様の結果であった (Fig. 25B)。

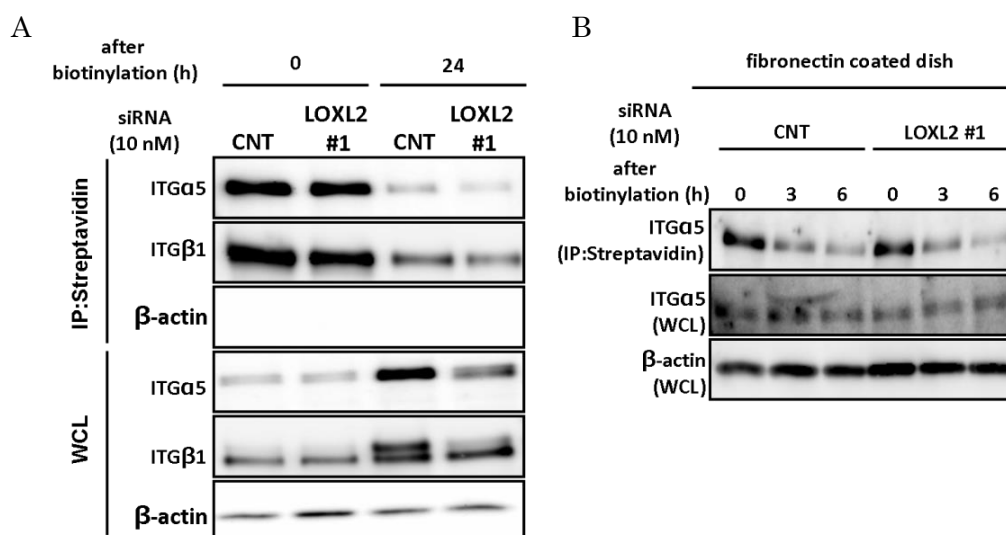


Fig. 25 細胞膜表在インテグリンビオチン化解析

A. 786-O 細胞に siRNA トランスフェクション 24 時間後膜タンパク質をビオチンラベル化し 0, 24 時間培養後細胞より streptavidin ビーズでビオチン化タンパク質を回収し、インテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ タンパク質量をウエスタンブロットで解析した。

B. フィブロネクチンコートディッシュ上で siRNA トランスフェクション 24 時間後膜タンパク質をビオチンラベル化し 0, 3, 6 時間培養後細胞より streptavidin ビーズでビオチンタンパク質を回収し、インテグリン $\alpha 5$ タンパク質量をウエスタンブロットで解析した。

さらに, LOXL2 ノックダウンがインテグリンの分解経路に関与するかどうかを検討した. プロテアーゼ阻害剤 leupeptin を用いてリソソーム系の関与を, そしてプロテアソーム阻害剤 MG132 を用いてユビキチン-プロテアソーム系の関与を検討した. LOXL2 ノックダウンによって低下したインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ タンパク質量が leupeptin 及び MG132 処理によって回復傾向を示した(Fig. 26A, B). これらの結果より, LOXL2 は細胞膜上のインテグリンタンパク質量ではなく, プロテアソーム及びリソソーム系を介して細胞内のインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ タンパク質量に影響を及ぼしている可能性が示唆された.

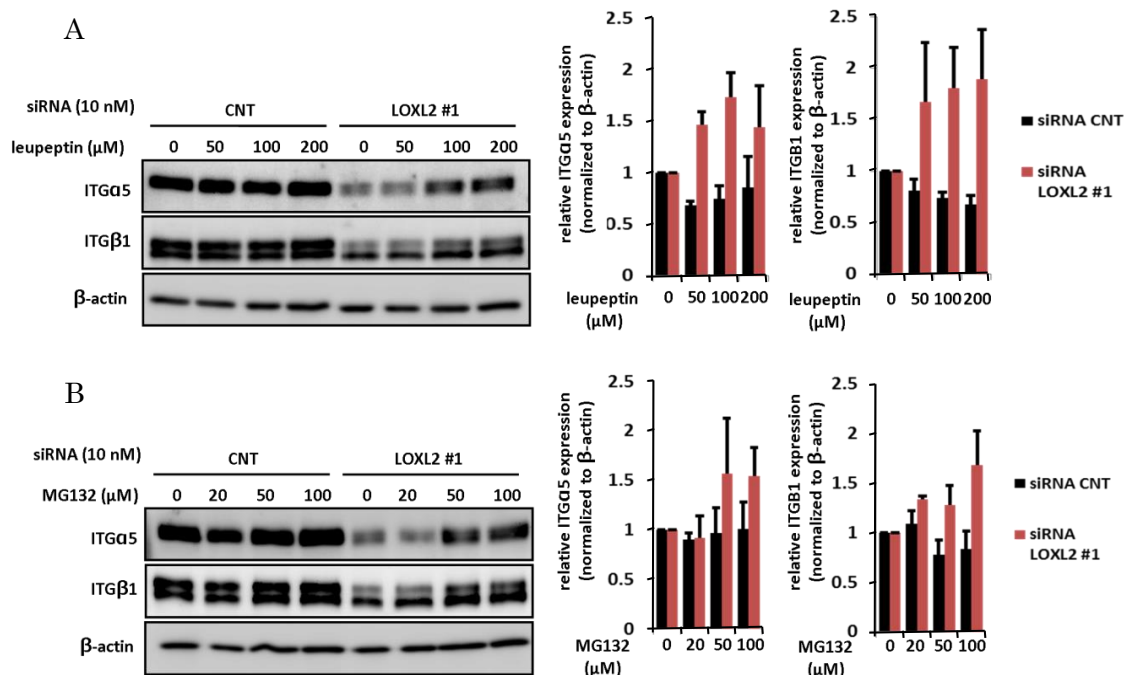


Fig. 26 タンパク質分解阻害剤処理時におけるインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ 発現解析.

A. プロテアーゼ阻害剤 leupeptin 12 時間処理時における LOXL2 ノックダウン 786-O のインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ 発現.

Data show mean \pm S.E. (n=3)

B. プロテアソーム阻害剤 MG132 1 時間処理時における LOXL2 ノックダウン 786-O のインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ 発現.

Data show mean \pm S.E. (n=3)

第 8 節 LOXL2 ノックダウン時におけるインテグリン 分解機序解析

第 7 節での実験結果より, LOXL2 はリソソーム系及びプロテアソーム系を介してインテグリンのタンパク質量に影響を及ぼしている可能性が示唆された. インテグリンはリボソームで翻訳された後に小胞体に入り, 糖鎖修飾を受け在るべき立体構造に変換された後にゴルジ体へと輸送され, さらに糖鎖修飾を受ける (20,21). インテグリンに限らずタンパク質のミスフォールドが起こると, ユビキチン化されその後プロテアソームにて分解されることが知られている (22). 小胞体内でインテグリンをユビキチン化する酵素はインテグリンファミリーのすべてにおいて同定されていないが, インテグリン $\beta 1$ に関しては Fbs1 E3 ubiquitin ligase によりユビキチン化される事が報告されている (23). また, Fbs1 によるインテグリン $\beta 1$ のユビキチン化が小胞体上の ATPase である p97 依存的に行われることも報告されている (24,25). そこで, LOXL2 ノックダウンによるインテグリンタンパク質量の低下が p97 を介しているのか否かを, p97 阻害剤である DBeQ を用いて検討した. その結果, インテグリン $\alpha 5$, αV , $\beta 3$ に対する LOXL2 ノックダウン効果には変化はなかったが, インテグリン $\beta 1$ に対する LOXL2 ノックダウン効果の減弱がみられた

(Fig. 27). この結果より, LOXL2 が p97 を介したインテグリン $\beta 1$ タンパク質分解に抑制的に働く可能性が示唆された,

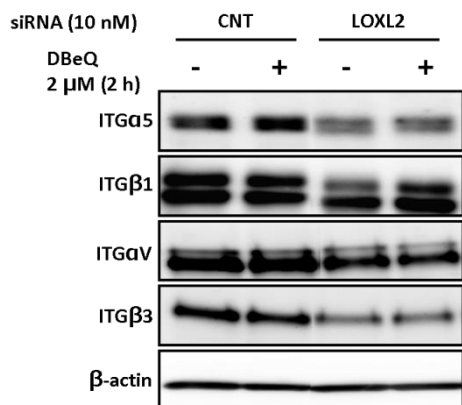


Fig. 27 LOXL2 ノックダウン 786-O 細胞のインテグリン発現における p97 の効果. 786-O 細胞 にコントロール siRNA と LOXL2 siRNA をトランスフェクションし, 48 時間後に p97 阻害剤 DBeQ (2 μM) を添加した. その 2 時間後にインテグリン ($\alpha 5$, $\beta 1$, αV , $\beta 3$) の発現をウエスタンブロットにより解析した.

第 9 節 LOXL2 ノックダウンが小胞体ストレスマーカー遺伝子発現に及ぼす影響

これまでの結果より, LOXL2 が小胞体上でインテグリン $\beta 1$ の E3 ubiquitin ligase である Fbs1 と協調して働くことが報告されている p97 を介して, インテグリン $\beta 1$ タンパク質量に影響を及ぼしている可能性が示唆された. Fbs1 はインテグリン $\beta 1$ がミスフォールディングした場合にユビキチン化することから, LOXL2 はインテグリン $\beta 1$ タンパク質のフォールディングに影響を及ぼしている可能性が考えられる. ミスフォールディングしたタンパク質が小胞体内に蓄積すると小胞体ストレスが引き起こされ, 各種シャペロンタンパク質の発現が誘導され, ミスフォールディングしたタンパク質のフォールディングを修復することが知られている(26).

LOXL2 ノックダウン時においてインテグリンのミスフォールディングが起きている可能性があり, また, アポトーシスが誘導されるという実験結果が得られていることから, LOXL2 が小胞体ストレスに及ぼす影響について検討を行った. 小胞体ストレスが起こると発現上昇することが報告されている ASNS, CHOP, GRP78 (27) について real-time PCR により検討した. その結果, 小胞体ストレスマーカー発現量は LOXL2 ノックダウンによって増加の傾向があるが顕著な差ではなく, 小胞体ストレスが起きているとは断定できなかった(Fig. 28).

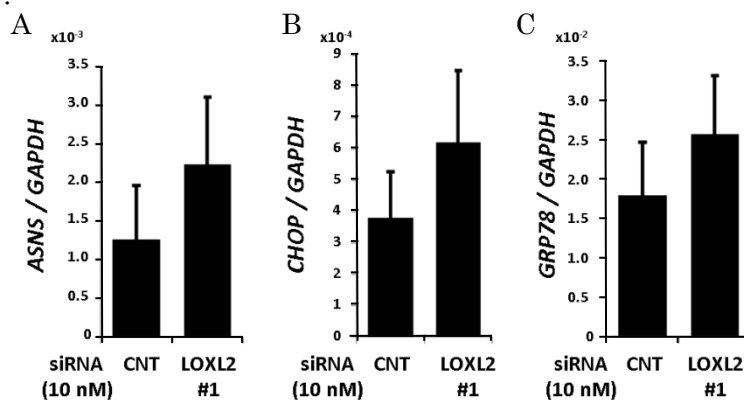


Fig. 28 LOXL2 ノックダウン 786-O 細胞における小胞体ストレスマーカー遺伝子 ASNS(A), CHOP(B), GRP78(C) の Real-time PCR 解析.

Data show mean ± S.D. (n=3)

第 10 節 LOXL2 による Ero1La 発現誘導

小胞体には正しくフォールディングされたタンパク質を供給するための機構がいくつか存在する(28,29). その中で LOXL2 が寄与し得る反応系として酸化のフォールディング機構に注目した. 酸化のフォールディングはタンパク質のジスルフィド結合形成を担っているが, 主に Protein disulfide isomerase (PDI), とそれを酸化し活性化させる Ero1L より成る. PDI family はヒトで 20 種存在するとされており, それぞれ細胞内分布や組織発現, 基質に対する選択性がある(30). ccRCC においてもいずれかの PDI family 分子が代償的に機能しつつ酸化のフォールディング機構を構築することで各インテグリンのフォールディングに寄与しているのではないかと考えた. 各種データベースを参照した結果, 中でも Ero1La の発現が ccRCC 癌部で発現亢進していることが示唆されていた. そこで LOXL2 が Ero1La 発現に与える影響を, LOXL2 をノックダウンならびに過剰発現させ Western blot にて検討した. その結果, LOXL2 発現量依存性に Ero1La タンパク質量が変化することが明らかとなった(Fig. 29)

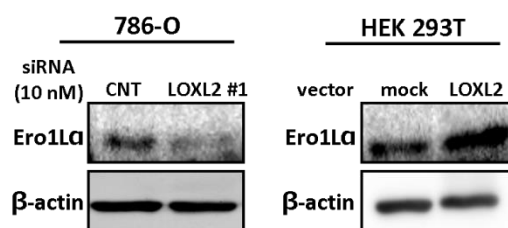


Fig. 29 LOXL2 による Ero1La の発現制御. LOXL2 のノックダウン 786-O 細胞(左図), 強制発現 HEK 293T 細胞(右図)における Ero1La の Western blot 解析.

第 11 節 ccRCC 臨床検体における各遺伝子の発現解析

ccRCC 臨床検体を用いた遺伝子発現解析や ccRCC 細胞株を用いた解析により LOXL2 が ccRCC において高発現し, インテグリン $\alpha 5$ や $\beta 1$, そして Ero1La の発現を調節している結果を得た. そこで, ccRCC 臨床検体においてこれら分子の発現がタンパク質レベルで相関性があるのかを Western blot にて検討した. ccRCC 癌部臨床検体とコントロールとしてヒト腎臓上皮細胞を用いた. その結果, LOXL2, インテグリン $\alpha 5$ は grade に相関して増加する発現パターンを認めた. また, Ero1La は LOXL2 と特に grade の高い臨床検体において発現の相関性がみられた (Fig. 30).

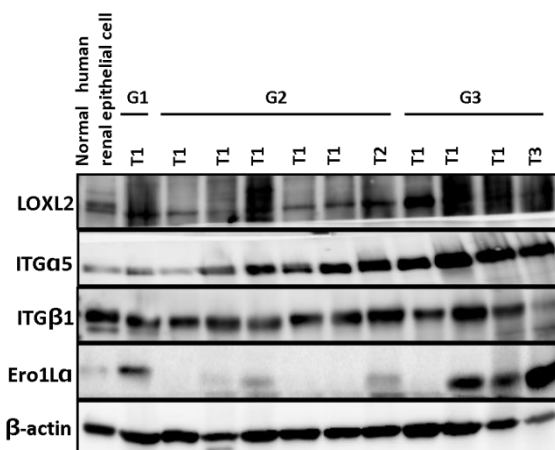


Fig. 30 ccRCC 臨床検体における LOXL2, インテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$, Ero1La タンパク質発現解析. ccRCC 臨床検体の癌部 lysate を grade (G1-G3) と T 分類 (T1-T3) に分けて電気泳動し, western blot 解析を行った.

第 12 節 小括

- ccRCC 細胞において LOXL2 はインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ をはじめ複数種のインテグリン family の発現増加に寄与する.
- LOXL2 は細胞膜輸送後のインテグリンタンパク質量に影響を及ぼさない.
- LOXL2 ノックダウンによって小胞体ストレスマーカーの発現は誘導されないが, p97 を介してインテグリン $\beta 1$ タンパク質分解反応を抑制している可能性が示唆された.
- LOXL2 は小胞体内タンパク質フォールディング反応の 1 つである酸化的フォールディングを担う因子 Ero1La の発現に影響を与えることが示された.
- ccRCC 臨床検体において LOXL2 , インテグリン $\alpha 5$, Ero1La のタンパク質発現と悪性度の相関性が見られた.

総括

腎細胞癌(RCC)は罹患数や死亡者数こそ他の癌に比べ低いものの、未だ納得のいく治療法が確立できておらず更なる治療薬の開発が望まれている疾患の1つである。本研究では RCC でも特に発症頻度が最も高い淡明細胞型腎細胞癌(ccRCC)について、その分子基盤の理解を目標に研究に取り組んだ。ccRCC の特徴として stage IV における極端な予後不良、そして放射線療法、化学療法が効かないなどが挙げられるが、ccRCC はその他多くの悪性腫瘍に比べて、その増殖速度が遅いと言われている。おそらくは、放射線療法や化学療法の効果が認められないのは ccRCC の細胞周期の回転が緩慢であることに由来するものと思われる。故に、stage IV で予後が悪化する原因は癌細胞の浸潤転移能に由来するものであり、ccRCC の分子基盤理解を目指すうえで最も重要であるのは浸潤転移を促進する機構であると思われる。

本研究では ccRCC 臨床検体を用いた遺伝子発現、メチル化レベルの網羅的解析により LOXL2 に焦点を当て、ccRCC 細胞における機能解析を試みた。LOXL2 の ccRCC 臨床検体における LOXL2 mRNA 量は原発巣の大きさ、stage に相関して増加していた。また、予後不良症例で ECM interaction, focal adhesion に関わる遺伝子発現の亢進が示唆されていたことを踏まえると、LOXL2 はこれらの機能に関わる分子の制御により、特に浸潤転移能促進に寄与することで予後不良に関わっている可能性が推測できた。これまでに報告されている機能より LOXL2 が ccRCC 細胞の EMT 促進に寄与していることが予想された。しかしながら、786-O 細胞において LOXL2 ノックダウン実験を行うと既に報告されているような snail の発現低下 (9) は誘導されたが、E-cadherin の発現増加や N-cadherin の発現低下といった EMT の逆反応である間葉上皮転換(Mesenchymal-Epithelial transition: MET) 様の反応は起こらず、その他 EMT 関連因子の発現についても顕著な変化が認められなかった (data not shown)。また、本検討における LOXL2 ノックダウン実験によって見られた細胞形態変化は EMT 抑制時に見られる細胞の敷石状への変化とは異なり、細胞伸展の変化であった。このような結果より、ccRCC における LOXL2 機能は既存の報告とは異なるメカニズムで ccRCC 細胞の浸潤転移能に寄与している可能性が考えられる。LOXL2 ノックダウン時に見られた focal adhesion 形成の減弱は乳がん細胞株を用いた検討により既に報告があるが (30)、その詳細な機序は明らかではなかった。本研究で明らかになった LOXL2 によるインテグリン発現制御は、LOXL2 による focal adhesion 形成そして ccRCC 細胞の浸潤転移メカニズムを理解する上で非常に重要な知見であると考えている。

本研究では、LOXL2 がインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ をはじめ複数種のインテグリン発現誘導に寄与する新たな知見を得た。本稿内においては ccRCC 細胞株の 786-O 細胞を用いた検討結果を載せているが、同じく ccRCC 細胞株である Caki1 細胞における LOXL2 ノックダウン実験も行っており、786-O 細胞を用いた際と同様にインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現低下及

び増殖能が低下する結果を得ている (data not shown). なおかつ HEK 293T 細胞に LOXL2 を強制発現させることでインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現が増加することを確認できた. これにより, LOXL2 が細胞外の環境だけでなく細胞内の仕組みをも制御することで, 特に FAK をはじめとしたシグナル伝達を強化し癌細胞の運動性を促し得ることがわかった. 中でも特に臨床検体で発現亢進が確認されたインテグリン $\alpha 5$ はインテグリン $\beta 1$ とのヘテロダイマーに対する抗体 volociximab が ccRCC の治療薬と成り得るとして臨床試験が行われている (32). この抗体医薬の主な意図は血管新生の阻害作用であることから, LOXL2 はインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ 発現を介して血管新生に寄与している可能性がある. また, インテグリン $\alpha 5$ に関する最近の知見として, そのリガンド ECM であるフィブロネクチンとの接着性のみならず, フィブロネクチン非依存的に c-MET と相互作用することで卵巣癌細胞の浸潤を促進する機能が報告されている (33). よって, ccRCC においても未だ知られていない機能により細胞形態や運動能の制御をなしている可能性があり興味深いところである.

本研究により, LOXL2 は ccRCC 細胞においてインテグリン $\beta 1$ 発現をそのフォールディング過程において正に制御する可能性を示唆するに至った. また, 他のインテグリンについても同様の機序が LOXL2 機能の影響を受けているのではないかと考えている. タンパク質のフォールディングは特定のタンパク質, 例えばコラーゲン等については特異的なシャペロンを介して立体構造が形成されることが報告されている(34). しかしながら, インテグリンについて特異的にフォールディングを促進する因子は未だ報告されていない. おそらくは他の膜タンパク質同様なプロセスを経て完成形に至っていると思われる. つまり, LOXL2 ノックダウンで見られたインテグリン発現抑制は, 他のタンパク質においてもある程度の影響を及ぼしていると考えられる. しかしその一方, LOXL2 ノックダウン 786-O 細胞では小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現に顕著な変化は認められなかった. このことは, LOXL2 の機能がなくなっても小胞体に異常なミスフォールドタンパク質の顕著な蓄積は起きていないことを示唆していると考えられ, LOXL2 によるインテグリンフォールディング反応への寄与は選択性を持った反応系であると推測された.

小胞体にはいくつかの正しく構造が保持されたタンパク質を供給するためのシステムが備えられている. 例えば, 糖タンパク質のフォールディングを担うカルネキシン/カルレチキュリン系, 分解すべきタンパク質を認識する ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein : EDEM タンパク質, 小胞体からゴルジ体へとタンパク質を輸送する際のチェック機構, 小胞体内在性のシャペロンタンパク質, そして本研究で着目した酸化的フォールディング反応系等である(27,28). Ero1La により活性化される PDI は親水性である SH 基を疎水性のジスルフィド結合形成へと触媒する酵素であることから, その働きは膜タンパク質の疎水性部分形成や, 分泌性タンパク質の安定性増加に寄与する (35). 現時点において Ero1La がどれほどインテグリン発現に影響を及ぼしているのか明

らかではないが、LOXL2 が Ero1 α を介してインテグリン以外のタンパク質のフォールディングにも関与している可能性があると考えている。

本研究では ccRCC において LOXL2 のどのような分子機能が重要であるのかを明らかにすることは出来なかったが、今後最も検討すべきはその lysyl oxidase 活性が必要なのか否かではないだろうか。LOXL2 の基質はコラーゲンやエラスチンに留まらないことが報告されていることから(9,10)、様々な分子に対して酵素活性を発揮し得ると考えられる。また、LOXL2 のみならずファミリータンパク質である LOX もコラーゲンやエラスチン以外を基質とし得ることが報告されているが、両者には機能的な差異があり、その原因は LOXL2 が持つ Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) ドメインに由来すると考えられている (8)。SRCR ドメインは膜タンパク質や分泌性のタンパク質に見られるドメインのひとつであるが、その機能については統一的な見解が持たれていない。現時点において LOXL2 の SRCR ドメインの役割について予測は困難であるが、インテグリンの発現制御や Ero1 α の発現に SRCR ドメインが重要なのか、SRCR ドメインを欠損させた LOXL2 変異体等を作成し、評価することで明らかになることが推測できる。

本研究の成果として、LOXL2 が ccRCC 細胞において Ero1 α を介してインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ や $\beta 1$ 等の発現を安定化させる機能を果たしていることを示すことができたが、それが Ero1 α による酸化的フォールディング反応を介しているのかは不明のままである。しかし ccRCC 臨床検体において Ero1 α タンパク質の特徴的発現が確認できたことは、浸潤や転移に関わる機能を示唆しているものと考えられる(Fig. 31)。

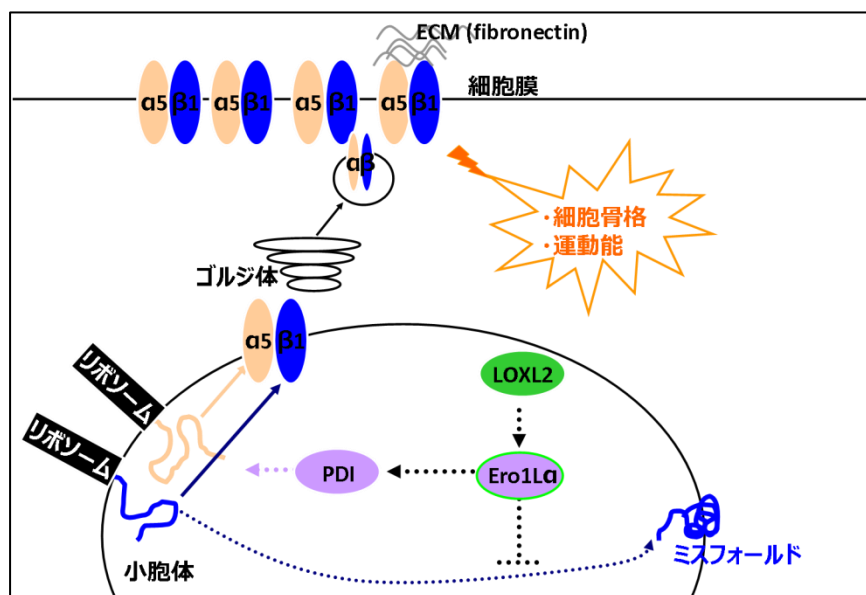


Fig. 31 ccRCC における LOXL2 機能模式図.

今後 LOXL2 を介した分子制御機構のさらなる解析により、ccRCC の分子基盤理解、そして創薬応用へと繋がることを期待できると考えている。

結論

本研究では、淡明細胞型腎細胞癌 ccRCC の悪性化に関わる 分子基盤の理解を目指し、LOXL2 に着目してその機能解析を試みた。その結果、以下に示す結論に至った。

- ccRCC において LOXL2 の発現が亢進している。
- LOXL2 はインテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ の発現亢進に寄与する。
- LOXL2 はインテグリン $\alpha 5$ の発現誘導を介して、癌細胞の浸潤転移亢進に寄与する可能性が示唆された。
- LOXL2 は小胞体上に存在する p97 を介してインテグリン $\beta 1$ タンパク質量に影響を及ぼしている可能性が示唆された。
- LOXL2 は Ero1L α の発現を安定化させる。

謝辞

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授、辻川 和丈先生に心より謝意を表します。

また、本研究に当たり種々のご指導を頂きました、大阪大学大学院薬学研究科特任助教、神宮司 健太郎先生、ならびに助教、上田 裕子先生に心より感謝致します。

また、ccRCC 臨床検体の御供与及び種々おご指導を頂きました大阪大学医学部泌尿器科野々村 祝夫先生、植村 元秀先生、藤田 和利先生、中田 渡先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を賜りました北惠郁緒里特任研究員、松本伊代特任研究員、小嶋美樹特任研究員、小林巧明特任研究員、大塩郁幹修士、江川博修士、伊藤千瑛学士、信貴奈緒子学士、香川朋美学士、川上竜司学士、富本千秋学士、柏木悠里特別研究生、喜多村悠加特別研究生、塚田陽平特別研究生、松本健太郎特別研究生をはじめとする大阪大学薬学研究科 細胞生理学分野の皆様、心より感謝致します。

参考文献

- (1) 厚生労働省大臣官房統計情報部「人口動態統計」
- (2) 日本泌尿器科学会・日本病理学会・日本医学放射線学会編「泌尿器科・病理・放射線科腎癌取り扱い規約」(2011)
- (3) Simon J, Cooper. Han W, Tun, Stephen M, Roper. Yune Kim, Thomas Kislinger, Richard R, Drake and John A, Current Status of Biomarker Discovery in Human clear Cell Renal Cell carcinoma. (2012) *J Mol Biomark Diagn* S:2.
- (4) Peter E. Clark, The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. (2009) *Kidney Int.* 76, 939–945.
- (5) Joachim P. Spatz, Alexander D, Environmental sensing through focal adhesions. (2009) *NatureReviews Molecular Cell Biology* 10, 21-33.
- (6) Miho M. Suzuki, Adrian Bird, DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. (2008) *Nature Reviews Genetics* 9, 465-476.
- (7) Marcos M, Ignacio P. C, Javier S, José F. P, and Angel P, Hypermethylation of the cell cycle inhibitor p15INK4b 3'-untranslated region interferes with its transcriptional regulation in primary lymphomas. (1999) *Oncogene* 18, 385-396.
- (8) Holly E, Thomas R, The rationale for targeting the LOX family in cancer. (2012) *Nature Reviews Cancer* 12, 540-552.
- (9) Héctor P, David O, Katalin C, Keith SK. F, Sonia V, Maria A. N, Amparo C, Francisco P, A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. (2005) *The EMBO Journal* 24, 3446–3458.
- (10) Nicolás H, Natàlia D, Alba M. R, Lluís M, Víctor ML. F, Ricardo G. G, Celia J, Luciano D. C, Antonio G. H, Sandra P, Lysyl Oxidase-like 2 Deaminates Lysine 4 in Histone H3. (2012) *Mol Cell.* 11, 369-76.

- (11) Gary J. D, Harvey T. M, Mediation, Modulation, and Consequences of Membrane-Cytoskeleton Interactions. (2008) *Annual Review of Biophysics* 37, 65-95.
- (12) Sari T, Gergana G, Pekka L, Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. (2012) *Journal of Cell Science* 125, 1855–1864.
- (13) M B Calalb, T R Polte, and S K Hanks, Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. (1995) *Mol Cell Biol.* 15, 954–963.
- (14) Jay S. D, David A, Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. (2010) *Nature Reviews Cancer* 10, 9-22.
- (15) Richard O. H, Kenneth M. Yamada, Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. (1982) *J. Cell Biol.* 95, 369-377.
- (16) Zuohua Z, Kristiina V, John C. R, Erkki R, The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 6161-6165.
- (17) Patrick T. C, Suryakiran V, Jim C, Integrins: masters and slaves of endocytic transport. (2009) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 843-85.
- (18) Ralph T. B, Christopher S, Alexander M, Hannelore M, Moritz W, Hui Y. T, Reinhard F, Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of $\beta 1$ integrins by binding to the $\beta 1$ -integrin tail. (2012) *Nature Cell Biology* 14, 584–592.
- (19) Viola H. L, Andreas B, Nina M. P, Jørgen W, Angela OL M, Harald S, Ubiquitination of $\alpha 5\beta 1$ Integrin Controls Fibroblast Migration through Lysosomal Degradation of Fibronectin-Integrin Complexes. (2010) *Developmental Cell* 19, 148-159.
- (20) Daniel B, Jeroen P, Nicola D. F, Johanna I, Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo (2013) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 430–442.

- (21) Wei S, Wei H, Ruijuan X, Junfei J, Zdzislaw M. S, Guofeng Z, Sehamuddin H. G, Lina M. O, Cungui M, Alkaline ceramidase 2 regulates β 1 integrin maturation and cell adhesion (2009) *FASEB* 23, 656–666.
- (22) Birgit M, Christian H, Ernst J, Thomas S, ERAD: the long road to destruction. (2005) *Nature Cell Biology* 7, 766 – 772.
- (23) Yukiko Y, Tomoki C, Fuminori T, Hiroshi K, Kazuhiro I, Toshiaki S, Yukishige I, Koji M, Minoru Y, Keiji T, Tadashi T, E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains (2002) *Nature* 418, 438-442.
- (24) Yukiko Y, Eru A, Kanako F, Kazuhiro I, Keiji T, Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates (2005) *EMBO reports* 6, 239 – 244.
- (25) Yihong Y, Yoko S, Chi Y, David R, Tom A. R, A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. (2004) *Nature* 429, 841-847.
- (26) Claudio H, The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. (2012) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 89-102.
- (27) Laetitia H, Liraz K, Aurélie H, Raphael S, Orna E. S, Odile B. T, Anne F, Evaluation of the endoplasmic reticulum-stress response in eIF2B-mutated lymphocytes and lymphoblasts from CACH/VWM patients. (2010) *BMC Neurology* 10, 94.
- (28) Lars E, Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway (1999) *Science* 286, 1882.
- (29) Tiziana A, Roberto S, Focus Quality Control Protein quality control in the early secretory (2008) *The EMBO* 27, 315–327.
- (30) Lars E, Lloyd W. R, The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. (2005) *EMBO Rep.* 6, 28–32.

- (31) Gema M. B, Fernando S, Alberto M, Alfredo F, Eva P. C, Vanesa S, Amalia M, Saleta M, Maria A. C, Alejandro R. S, Alejandra M, David H, Katalin C, Francisco P, Héctor P, José P, Amparo C, Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas. (2011) *EMBO Mol Med.* 3, 528–544.
- (32) C. Lance Cowey, W. Kimryn Rathmell, Using Molecular Biology to Develop Drugs for Renal Cell Carcinoma. (2008) *Expert Opin Drug Discov.* 3, 311–327.
- (33) A. K. Mitra, K Sawada, P Tiwari, K Mui, K Gwin, E. Lengye, Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha 5\beta 1$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis (2011) *Oncogene* 30, 1566–1576.
- (34) Yoshihito I, Kazuhiro N, Chapter nine – Hsp47 as a Collagen-Specific Molecular Chaperone. (2011) *Methods in Enzymology* 499, 167–182.
- (35) Matthias J. F, Linda M. H, Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. (2011) 23, 167-175.