

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18412

研究課題名(和文)細胞接着分子CADM1によるHippo経路の制御機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of CADM1 in the regulation of Hippo pathway

研究代表者

伊東 剛 (Ito, Takeshi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：20733075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo経路は接触阻止や器官サイズの制御を担う、接着分子を受容体とする腫瘍抑制シグナルだと考えられているが、哺乳細胞においてその接着受容体は特定されていなかった。本研究において、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子CADM1がHippo経路の構成分子との相互作用を介してYAP1のリン酸化を促進し、YAP1標的遺伝子の発現を低下させることを示した。したがって、CADM1は哺乳細胞におけるHippo経路の接着受容体として機能し得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳細胞におけるHippo経路の受容体は同定されておらず、細胞接着を感知しMST-LATSキナーゼカスケードの活性化に至るまでの分子機構は空白地帯となっていた。本研究はCADM1がHippo経路の接着受容体として機能し、足場タンパク質NF2, KIBRA, SAV1、キナーゼMST1/2, LATS1/2との相互作用を介してHippo経路を活性化するという分子機構を初めて示した点に大きな学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Hippo pathway is involved in the regulation of contact inhibition and organ size control by sensing cell density through adhesion receptors in *Drosophila*, but the receptors have not been identified in mammalian cells. In this study, we showed that CADM1, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule, enhanced YAP1 phosphorylation and repressed the expression of YAP1 target genes through interaction with multiple Hippo pathway components. These results suggest that CADM1 would function as an adhesion receptor of Hippo pathway in mammalian cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Hippo経路 細胞接着

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Hippo 経路は細胞接着及び細胞極性の形成により活性化され、細胞増殖の接触阻止や器官サイズを制御するシグナル伝達経路である。Hippo 経路は細胞外からの入力を受けて MST-LATS キナーゼカスケードが活性化し、転写共役因子 YAP/TAZ をリン酸化し核外へ移行させることにより不活化する経路で、ショウジョウバエからヒトに至るまで広く保存されている。裏打ちタンパク質 FRMD6/Willin, NF2/Merlin, WWC1/Kibra は細胞外からのシグナルを MST キナーゼに伝達する。YAP は Hippo 経路のエフェクター分子であり、転写因子 TEAD と複合体を形成して細胞増殖やアポトーシス抑制に関与する遺伝子群の発現を誘導する。Hippo 経路が活性化すると YAP は LATS キナーゼにより 127 番目のセリン残基がリン酸化され、アダプタータンパク質 14-3-3 と結合して核から細胞質へと同在が移行することにより転写共役因子としての機能を失う。様々なヒトの腫瘍において Hippo 経路分子の変異や発現異常が報告されており、Hippo 経路の制御の破綻は腫瘍の発生及び進展を促進すると考えられている。

細胞外からの接着シグナルを Hippo 経路へ伝達する受容体として、ショウジョウバエにおいては非典型的カドヘリン Fat 及び Dachous、免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子 Echinoid が知られている。哺乳類における Fat のホモログ FAT4 は足場タンパク質 AMOTL1 を介して YAP を細胞質につなぎとめることにより YAP を不活化する。Echinoid のホモログ Hemicentin 1 は細胞外マトリックスタンパク質であり、Hippo 経路への関与を示す報告はない。哺乳類細胞における Hippo 経路の接着受容体として、E-cadherin が β -catenin を介して YAP を細胞質につなぎとめて不活化することが報告されているが、ショウジョウバエに認められるような MST-LATS キナーゼにシグナルを入力する Hippo 経路の接着受容体は同定されていない。

免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子をコードする *CADM1* 遺伝子は非小細胞肺がんのがん抑制遺伝子であり、*CADM1* は隣接細胞間においてトランス-ホモ二量体を形成し細胞間接着、上皮構造の形成・維持に寄与している。*CADM1* の発現欠如は非小細胞肺がんの腫瘍径、病期、リンパ節転移、血管侵襲、予後不良と相関し、*CADM1* は肺の上皮内腺がん及び乳頭型腺がんの置換性増殖部位では発現を認める一方で、充実性増殖部位では高頻度に発現が欠如する。また、*CADM1* は細胞内領域に 4.1 タンパク質結合モチーフ及び PDZ II 結合モチーフを有し、4.1 タンパク質及び膜結合性グアニル酸キナーゼ (MAGuK: membrane-associated guanylate kinase homologue) と結合するが、ショウジョウバエにおいて 4.1 ファミリーの Merlin、MAGuK ファミリーの Discs large 及び Stardust は Hippo 経路への関与が報告されている。したがって、*CADM1* は細胞接着シグナルを細胞内へ伝達する Hippo 経路の受容体の一つとして機能し、腫瘍抑制に働く可能性が考えられた。

2. 研究の目的

Hippo 経路は接触阻止や器官サイズの制御を担う、接着分子を受容体とする腫瘍抑制シグナルであると考えられているが、その受容体は特定されていない。免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子 *CADM1* は、その発現欠如が非小細胞肺がんをはじめとする種々のがんにおいて増殖及び浸潤を促進し、Hippo 経路の接着受容体の一つとして機能することが予想される。本研究は、*CADM1* による Hippo 経路の制御の分子機構について検討し、*CADM1* の腫瘍抑制効果が Hippo 経路を介しているかどうか明らかにすることを目的として行う。

3. 研究の方法

CADM1 が Hippo 経路を制御する分子機構を明らかにするために、*CADM1* のノックダウンまたは過剰発現により YAP/TAZ のリン酸化および標的遺伝子の発現に変化があるかどうか検討する。*CADM1* と Hippo 経路分子との相互作用を網羅的に探索し、さらに *CADM1* の結合分子である 4.1 および MAGuK ファミリー分子の Hippo 経路における関与を検討することにより *CADM1* による Hippo 経路制御の詳細な分子機構を明らかにする。加えて、*CADM1* の腫瘍抑制能が Hippo 経路を介したものであるかどうかを細胞株の増殖アッセイおよびヒト検体の免疫染色により検討する。

4. 研究成果

(1) *CADM1* は線維芽細胞 NIH3T3 の YAP1 過剰発現による細胞密度の上昇を抑制する

NIH3T3 細胞は YAP1 の過剰発現により細胞増殖の亢進ならびに飽和細胞密度の上昇が起こる (Zhao et al, *Genes Dev*, 2007)。*CADM1* を YAP1 と co-transfection した場合に、YAP1 単独の場合と比較して飽和密度が *CADM1* により有意に抑制された。*CADM1* のみを導入した場合、細胞密度に変化は認められなかった。したがって *CADM1* は細胞接着を介して YAP1 依存的な細胞密度の検知に関与し、*CADM1* の不活化は接触阻止の喪失につながることを示唆された。

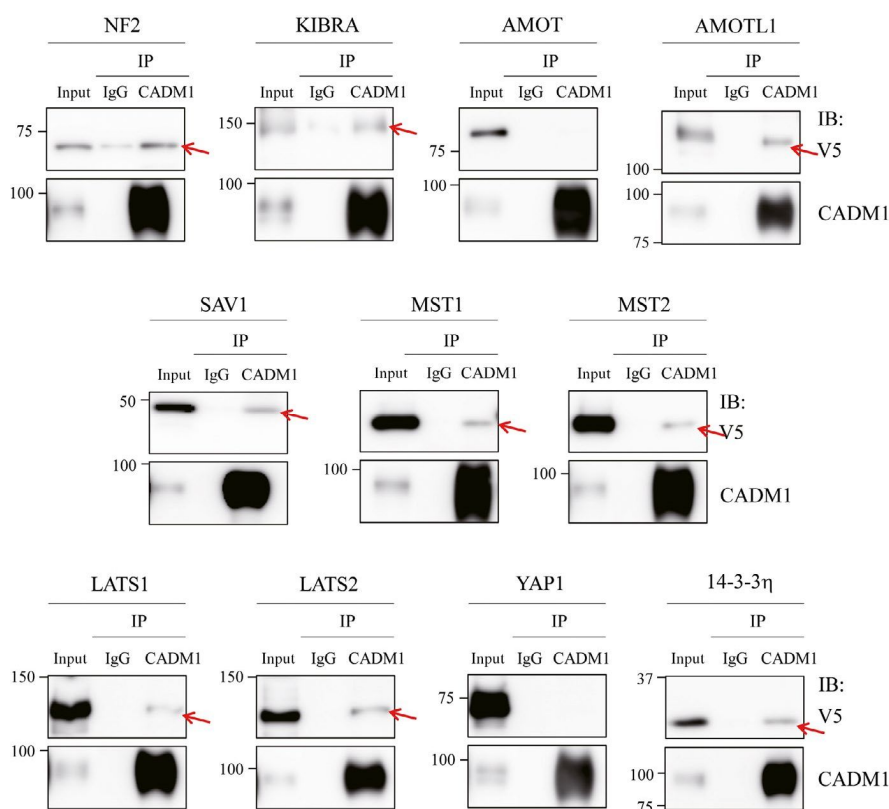
(2) *CADM1* は肺腺がん細胞 HCC827 において YAP1 のリン酸化を亢進する

非小細胞肺がんにおいて *CADM1* が Hippo 経路の制御に関与するかどうかを明らかにするために、上皮様の細胞形態を示し、*CADM1* の発現が低い肺腺がん細胞 HCC827 を用いて、*CADM1* 発現株を作製し検討を行った。*CADM1* 発現株はコントロール株と比較して形態に明らかな差はなく、シャーレ上での増殖速度にも有意な差を認めなかった。*CADM1* 発現株とコントロール株を低密度及び高密度条件下で培養し、ウェスタンブロット法により Hippo 経路構成分子の発現及びリン酸化を検討したところ、LATS1/2 及び YAP の発現には差を認めなかったが、高密度培養した

CADM1 発現株において YAP1 のリン酸化が有意に高く、さらに YAP1 の標的遺伝子である *ANKRD1* 及び *CYR61* の mRNA 発現が有意に低かった。したがって、CADM1 はコンフルエント状態の細胞で隣接細胞間におけるトランス - ホモ二量体形成を介して YAP1 のリン酸化を亢進し、YAP1 標的遺伝子の発現を低下させることが示唆された。

(3) CADM1 は Hippo 経路の複数の構成分子と相互作用する

CADM1 による Hippo 経路の制御機構を明らかにするために、V5 タグを付加した Hippo 経路の構成分子を HEK293 細胞に一過性にトランスフェクションし、CADM1 との共沈が認められるかどうか抗 CADM1 抗体を用いた共免疫沈降法により検討した。その結果、CADM1 は足場タンパク質の NF2, KIBRA, AMOTL1, SAV1、キナーゼの MST1/2 及び LATS1/2、アダプタータンパク質の 14-3-3 との共沈を認めた。一方で、CADM1 は AMOT 及び YAP1 とは共沈しなかった (図)。MST 及び LATS キナーゼは、それぞれ足場タンパク質の NF2 及び SAV1 により細胞膜にリクルートされ LATS が MST からリン酸化を受ける (Yin et al, *Cell*, 2013)。このことから、CADM1 は足場タンパク質群及び MST-LATS キナーゼを細胞膜へリクルートすることにより Hippo 経路を活性化することが示唆された。なおこの機構は、ショウジョウバエにおいて Echinoid が Hippo 経路を活性化する機構 (Yue et al, *Dev Cell*, 2012) と類似している。



(4) 肺腺がんにおいて CADM1, LATS2 の両方が欠如した場合に YAP1 の核局在が予後不良を示す

CADM1 は Hippo 経路の構成分子との相互作用を介して YAP1 を不活化することが細胞株において示されたことから、肺腺がん症例における検討のために、CADM1, LATS2, YAP1 に関してヒト肺腺がん検体 156 症例の免疫組織化学的解析を行った。CADM1 及び LATS2 は非小細胞肺がんのがん抑制遺伝子であることが報告されており、共に低グレードの上皮内腺がんでは細胞接着面に沿って発現を認める一方、高グレードの腺がんにおいては高頻度に発現欠如が認められた。両分子の発現には有意な相関が認められ、共局在していることが示唆された。YAP1 は低/中グレードの腺がんにおいて核または細胞質に発現し、高グレードの腺がんでは高頻度に発現が欠如しているが、一部の腺がんでは核に発現を認めた。

CADM1 の膜局在、LATS2 の膜局在、YAP1 の核局在の有無に基づいて肺腺がん症例を 8 通りに分類し、無病生存率を比較した。CADM1, LATS2 の両方が膜局在を示す症例は、YAP1 の発現に関わらず最も予後良好であった一方で、CADM1, LATS2 の両方が発現欠如し、YAP1 が核局在を示す症例は最も予後が悪かった。浸潤性腺がんに着目すると、YAP1 核陽性の場合、CADM1 及び LATS2 が陰性の症例は、両分子が膜局在の症例と比較して有意に予後不良であった。したがって、肺腺がんにおける YAP1 の腫瘍促進的な機能は、細胞膜に共発現する CADM1 及び LATS2 により抑制されていることが示唆された。

以上の結果から、CADM1 が肺腺がんにおいて Hippo 経路の接着受容体として機能し、YAP1 の制御を介して腫瘍抑制に寄与することが示唆され、この内容を *Cancer Science* 誌に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

1. Ito T, Nakamura A, Tanaka I, Tsuboi Y, Morikawa T, Nakajima J, Takai D, Fukayama M, Sekido Y, Niki T, Matsubara D, Murakami Y. CADM1 associates with Hippo pathway core kinases; membranous co-expression of CADM1 and LATS2 in lung tumors predicts good prognosis. *Cancer Sci*, in press. doi: 10.1111/cas.14040. 査読有
2. Ito T, Kumagai Y, Itano K, Maruyama T, Tamura K, Kawasaki S, Suzuki T, Murakami Y. Mathematical analysis of gefitinib resistance of lung adenocarcinoma caused by MET amplification. *Biochem Biophys Res Commun*, 511(3): 544-550, 2019. 査読有
3. Itano K, Ito T, Kawasaki S, Murakami Y, Suzuki T. Mathematical modeling and analysis of ErbB3 and EGFR dimerization process for the gefitinib resistance. *JSIAM Letters*, 10: 33-36, 2018. 査読有
4. Ito T, Kasai Y, Kumagai Y, Suzuki D, Ochiai-Noguchi M, Irikura D, Miyake S, Murakami Y. Quantitative analysis of interaction between CADM1 and its binding cell-surface proteins using surface plasmon resonance imaging. *Front Cell Dev Biol*, 6: 86, 2018. 査読有
5. Nakano T, Kanai Y, Amano Y, Yoshimoto T, Matsubara D, Shibano T, Tamura T, Oguni S, Katashiba S, Ito T, Murakami Y, Fukayama M, Murakami T, Endo S, Niki T. Establishment of highly metastatic KRAS mutant lung cancer cell sublines in long-term three-dimensional low attachment cultures. *PLoS One*, 12(8): e0181342, 2017. 査読有
6. Fujiki K, Yano S, Ito T, Kumagai Y, Murakami Y, Kamigaito O, Haba H, Tanaka K. A one-pot three-component double-click method for synthesis of [⁶⁷Cu]-labeled biomolecular radiotherapeutics. *Sci Rep*, 7(1): 1912, 2017. 査読有
7. Ito T, Matsubara D, Tanaka I, Makiya K, Tanei Z, Kumagai Y, Shiu SJ, Nakaoka HJ, Ishikawa S, Isagawa T, Morikawa T, Shinozaki-Ushiku A, Goto Y, Nakano T, Tsuchiya T, Tsubochi H, Komura D, Aburatani H, Dobashi Y, Nakajima J, Endo S, Fukayama M, Sekido Y, Niki T, Murakami Y. Loss of YAP1 defines neuroendocrine differentiation of lung tumors. *Cancer Sci*, 107(10): 1527-1538, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 15件)

1. Takeshi Ito et al. Mathematical modeling of gefitinib resistance of lung adenocarcinoma caused by MET amplification. Core-to-Core Meeting 2019, 2019/3/22, Bordeaux, France.
2. Takeshi Ito et al. CADM1 enhances extravasation of adult T-cell leukemia cells. Keystone Symposia: Cancer Metastasis-The Role of Metabolism, Immunity, and the Microenvironment, 2019/3/17, Florence, Italy.
3. 伊東剛 他. CADM1 スプライスバリエーションを標的とした小細胞肺癌に対する新規腫瘍マーカーの開発. 第41回日本分子生物学会年会, 2018/11/29, 横浜.
4. 中村敦子, 伊東剛 他. 肺腺がんにおける Hippo 経路の細胞接着分子 CADM1 による制御. 第41回日本分子生物学会年会, 2018/11/28, 横浜.
5. 伊東剛 他. CADM1 は成人 T 細胞白血病の血管外遊出を促進する. 第77回日本癌学会学術総会, 2018/9/28, 大阪.
6. 伊東剛 他. 肺腺がんの MET 増幅依存的ゲフィチニブ体制の数値モデルを用いた解析. 第27回日本がん転移学会学術総会, 2018/7/19, 横浜.
7. Takeshi Ito et al. Development of a novel tumor marker for small cell lung cancer by targeting a splicing variant of Cell adhesion molecule 1. The 6th JCA-AACR Special Joint Conference, 2018/7/11, 京都.
8. Takeshi Ito et al. Mathematical modeling of gefitinib resistance of lung adenocarcinoma caused by MET amplification. Core-to-Core Meeting 2018, 2018/3/19, St. Andrews, UK.
9. 笠井優, 伊東剛 他. 表面プラズモン共鳴イメージングを利用した細胞表面分子間相互作用のスクリーニング. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017/12/9, 神戸.
10. 伊東剛 他. 肺腺がんの MET 増幅型ゲフィチニブ耐性の数値モデルを用いた解析. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017/12/6, 神戸 (招待講演).
11. 伊東剛 他. 肺腺がんの MET 増幅型ゲフィチニブ耐性の数値モデルを用いた解析. 第76回日本癌学会学術総会, 2017/9/29, 東京.
12. Takeshi Ito et al. Mathematical analysis of the dynamics of CADM1 and its role in MET-driven resistance of lung adenocarcinoma against EGFR-TKI. Core-to-Core Meeting 2017, 2017/3/28, Nashville, USA.
13. 中村敦子, 伊東剛 他. Hippo シグナル経路の制御における細胞接着分子 CADM1 の関与. 第39回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 横浜.
14. 伊東剛 他. 肺がんにおける YAP1 欠如と神経内分泌分化について. 第2回 AMED 若手研究

者ワークショップ, 2016/11/29, 東京.

15. 伊東剛 他. *MET* 遺伝子増幅型 gefitinib 耐性肺腺がんにおける細胞接着分子 CADM1 の機能の数理モデリング. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 横浜 (招待講演).

〔図書〕(計 2 件)

1. 伊東剛, 櫻井(八下田)美佳, 村上善則. 細胞接着分子 CADM1 複合体の動態解明-指数関数あてはめを用いた FRAP データの解析. *実験医学*, 35(5): 162-165, 2017.
2. 伊東剛, 村上善則. 小細胞肺がん特異的 CADM1 スプライスバリエントを標的とした診断・治療法の開発. *がん分子標的治療*, 14(4): 87-90, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: CADM1v9 認識抗体

発明者: 村上善則、伊東剛、浜窪隆雄、岩成宏子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-049435 号

出願日: 2018 年 3 月 16 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/hitogan/index.html>

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。