

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790276

研究課題名（和文） 小細胞肺癌特異的に発現する TSLC1 スプライシングバリエントの癌転移における意義

研究課題名（英文） The role of a small cell lung cancer -specific alternative splice variant of TSLC1 in metastasis.

研究代表者

岩井 美和子 (Iwai Miwako)

東京大学・医科学研究所・技術専門職員

研究者番号：50396884

研究成果の概要（和文）：小細胞肺癌は肺がんの約20%を占め、化学療法が一時的には奏功するものの予後不良の難治がんであるが、分子標的療法は確立されていない。本研究では、小細胞肺癌細胞株及び小細胞肺癌組織で細胞接着分子 TSLC1/CADM1 が高頻度に過剰発現し、正常肺・脳では認めない特異的スプライシングを受けていることを見出した。この TSLC1 バリエントを強制発現させた小細胞肺癌細胞は腫瘍形成能が亢進することから小細胞肺癌の悪性増殖・転移能と強く相関している可能性が示唆された。更にこのスプライシング・バリエントは診断マーカーとして利用できる可能性も見出した。

研究成果の概要（英文）：Small cell lung cancer (SCLC) accounts for about 20% of lung cancer in Japan. Although chemotherapy is initially effective to SCLC, SCLC often becomes resistant to any therapeutic approaches. Molecular targeting therapy, however, has not been established so far against SCLC. In this study, we found that a cell adhesion molecule, TSLC1/CADM1, was frequently overexpressed in cancer cells and primary tumors from SCLC, and showed a specific splicing isoform which was not observed in normal lung or brain. Furthermore, the exogenous expression of this variant TSLC1 promoted the tumorigenicity of SCLC cells in nude mice. These findings suggested that this splicing variant was associated with the malignant growth and metastasis of SCLC and could provide a useful marker for the diagnosis of SCLC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：分子生物学・生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理・小細胞肺癌・細胞接着分子・TSLC1/CADM1・スプライシングバリエント

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌は早期から高い転移性を示し、一時的には抗癌剤に反応するものの、すぐに治療抵抗性の癌細胞が出現し不幸な転帰に至る難治性腫瘍の代表であり、その分子機構、特に転移と抗癌剤抵抗性の分子病理学的解

明に基づく新たな対策が強く望まれている。細胞接着分子 TSLC1/CADM1 は非小細胞肺癌 (NSCLC) を含む様々な上皮系の癌において腫瘍抑制に関与する一方で、成人 T 細胞白血病においては腫瘍増殖や組織浸潤に関与することが知られている。TSLC1 の過剰発現が、

上皮性腫瘍ながら極めて高い転移性を示す小細胞肺癌でも同様に認められることに注目し、小細胞肺癌で過剰発現する TSLC1 分子種が、上皮や脳、ATL には認められず、正常では精巣にしか認められない特異的スプライシング・バリエントであること、このバリエントは糖鎖修飾の相違をもたらす可能性があることを新たに見出した。そこで、小細胞肺癌における TSLC1 スプライシング・バリエントの意義を分子病理学的に明らかにする研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

難治性腫瘍の代表である小細胞肺癌の高転移性、抗癌剤抵抗性の分子機構を解明し、その診断、治療の分子標的を同定することは、癌の分子病理学的研究の大きな課題の一つである。そこで、小細胞肺癌で高頻度に認められる細胞接着分子 TSLC1/CADM1 の特異的なスプライシング・バリエントの過剰発現に注目し、その病理学的実態を把握し、その機能を転移性や抗癌剤抵抗性獲得の見地から明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)小細胞肺癌における TSLC1 の過剰発現の実態の把握

16種類の小細胞肺癌細胞株における TSLC1 の発現量を RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により解析し、その形態との関連性を見出す。また、小細胞肺癌組織における TSLC1 の発現を免疫組織解析により確認する。

(2)小細胞肺癌に特異的に発現するスプライシング・バリエントの実態の把握

小細胞肺癌および非小細胞肺癌細胞株、マウス全臓器における TSLC1 のスプライシング・バリエントの発現様式を RT-PCR 法、SSCP 電気泳動法を用いて解析する。更に N-グリコシ

ダーゼ処理により糖鎖をはずしてからウエスタンブロットティングを行うことによりタンパクレベルでの検出を行う。

(3)TSLC1 スプライシング・バリエントの小細胞肺癌細胞株における形態、増殖に関する効果の解析

TSLC1 の発現がみられない SBC5 などの壁付着性の細胞において特異的スプライシング・バリエントの全長 TSLC1 cDNA を外因性に発現する安定細胞株を作成して、その形態変化の観察、軟寒天培地中のコロニー形成能の解析、ヌードマウス皮下注における腫瘍形成能・転移性の解析を行う。

(4)スプライシング・バリエントのがん診断マーカーとしての可能性の検討

小細胞肺癌において高頻度に見られる TSLC1 の特異的スプライシング・バリエントの過剰発現に着目し、血液中等に TSLC1 の分解産物が放出されると考えた場合、がん診断マーカーとなりうる。そこで、SBC5 の TSLC1 安定発現株および TSLC1 を発現している小細胞肺癌細胞培養上清中のタンパク質を濃縮し、TSLC1 の細胞外ドメインに対する抗体を用いたウエスタンブロットティングにより分解産物の検出を試みる。

4. 研究成果

(1)小細胞肺癌における TSLC1 の過剰発現の実態の把握

16種類の小細胞肺癌細胞株における TSLC1 の発現量を RT-PCR 法(図 1A)およびウエスタンブロットティング法(図 1B)により解析した。その結果、浮遊細胞性を示す 12 種類の細胞では TSLC1 の発現が認められたのに対し、付着性増殖を示す 2 種の細胞は TSLC1 の発現がほぼ見られなかった。また、細胞肺癌組織にお

ける免疫組織解析では、34 例中 9 例(26%)で TSLC1 の高発現が認められた(図 1C)。

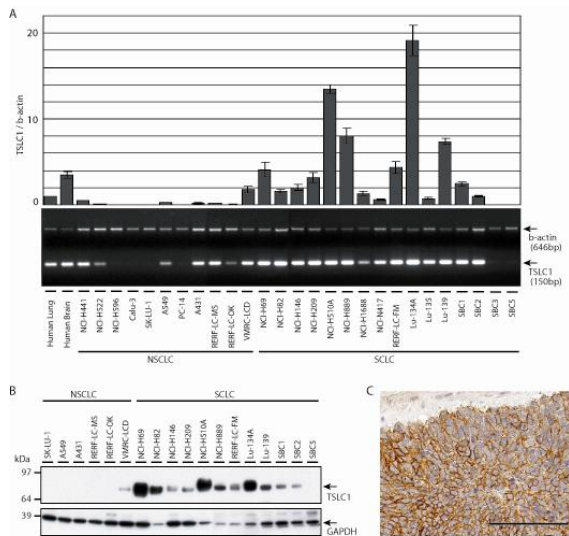


図 1. 小細胞肺癌における TSLC1 の過剰発現
A. RT-PCR 解析、B. ウェスタンブロッティング解析、C. 免疫組織解析

(2) 小細胞肺癌特異的スプライシングバリエントの実態の把握

TSLC1 には細胞膜直上のエクソン 8A, 8B, 8C を含む多様なスプライシング・バリエントが存在し、上皮では 8A 型、脳・神経では 8(-)型、精巣では 8B 型、8A+8B 型が発現する。小細胞肺癌および非小細胞肺癌細胞株、マウス各臓器における TSLC1 のスプライシング・バリエントの発現様式を RT-PCR 法及び SSCP 法を用いて解析したところ、TSLC1 を発現する全ての小細胞肺癌 12 例では、正常においては精巣でしか認められない 8A+8AB 型特異的スプライシング・バリエントが 8A 型と共に認められた(図 2A-C)。また、N-グリコシダーゼ処理により糖鎖修飾を切断してウェスタンブロッティングを行うことで、蛋白質レベルでも特異的スプライシング・バリエントが発現していることが確認された(図 2D)。

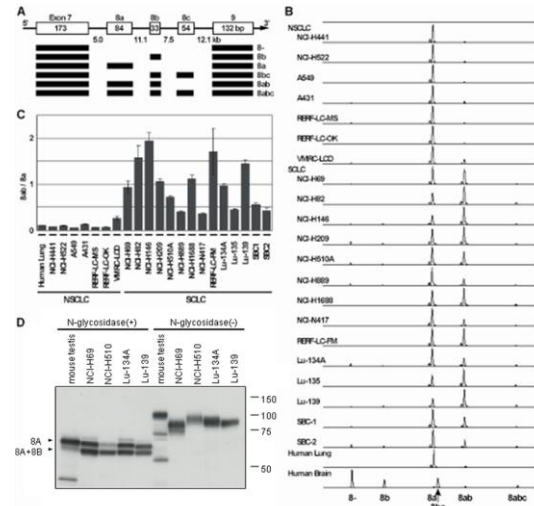


図 2. 小細胞肺癌特異的スプライシング・バリエント
A. 6 種類の TSLC1 スプライシング・バリエントの模式図 B, C SSCP 解析(B)および RT-PCR 法(C)によるスプライシング・バリエントの検出 D. N-グリコシダーゼ処理による、タンパクレベルでのスプライシング・バリエントの検出

(3) スプライシング・バリエントの小細胞肺癌細胞株における意義の解析

TSLC1 の発現が見られない壁付着性の小細胞肺癌細胞株に 8A+8B 型及び 8A 型の全長 TSLC1 cDNA を外因性に発現する安定細胞株を作成した(図 3A)。TSLC1 発現による形態変化はみられず、また軟寒天培地中のコロニー形成能にも差は認められなかった。ヌードマウスにおける腫瘍形成能を比較したところ、空ベクター導入細胞に比べ、TSLC1 発現株では腫瘍形成能が亢進し(図 3B)、TSLC1 が小細胞肺癌においては悪性増殖に関わる分子であることが示唆された。

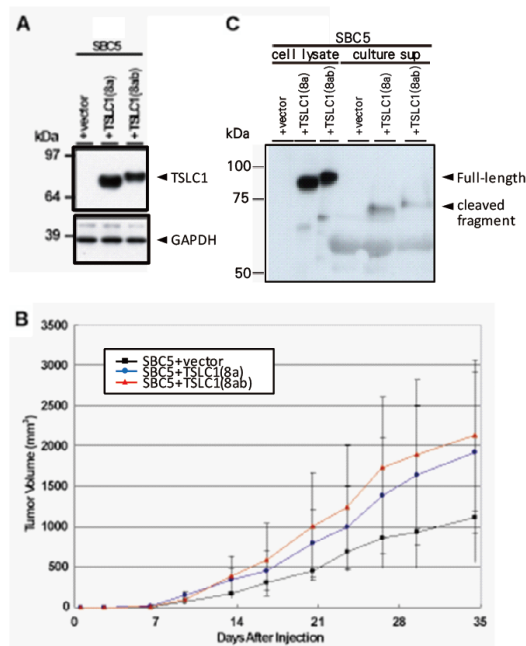


図3. 小細胞肺癌細胞株、SBC5におけるTSLC1安定発現株の腫瘍形成能およびがん診断マーカーとしての可能性 A. 安定発現株のウェスタンブロット解析 B. ノードマウス皮下注における腫瘍形成能の比較 C. 細胞培養上清におけるTSLC1分解産物の検出

(4) スプライシング・バリエントのがん診断マーカーとしての可能性の検討

(3)において作成した、TSLC1安定発現株の細胞培養上清を濃縮後、ウェスタンブロットングにより、TSLC1の細胞外ドメインに対する抗体を用いて検出したところ、膜直上で切断されたと思われる分解産物を検出することができた(図3C)。この分解産物は、8A型と8A+8B型でサイズに差がみられる。同様に、TSLC1を発現している小細胞肺癌の培養上清からもスプライシング・バリエント特異的分解産物を検出できた。これらの結果は、小細胞肺癌患者の血清からスプライシング・バリエント特異的分解産物を検出できる可能性を示唆しており、がん診断マーカーとして利用できる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Ito T, Williams-Nate Y, Iwai M, Tsuboi Y, Hagiya M, Ito A, Sakurai-Yageta M, Murakami Y. Transcriptional regulation of the CADM1 gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells. *Genes to Cells*, 査読有、2011、掲載確定

② Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, Murakami Y. Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*, 査読有、2011 Apr 28 [Epub ahead of print]

③ 蝦原康宏、岩井美和子、吉田昌史、安藤瑞生、朝蔭孝宏、山嵜達也、村上善則、頭頸部癌におけるTP53・EGFR遺伝子異常の解析、頭頸部癌、査読有、37(1):1-6, 2011

[学会発表] (計8件)

① 菊池 慎二、細胞接着分子CADM1の小細胞肺癌における特異的スプライシングバリエントの同定、第51回日本肺癌学会総会、2010年11月4日、広島国際会議場

② 村上善則、Involvement of a cell adhesion molecule CADM1/TSLC1 in oncogenesis、The 15th Charles Heidelberger International Symposium on Cancer Research、2010年1月18日-20日、タイ国、ピサヌロック市

③ 村上善則、Involvement of a cell adhesion molecule CADM1/TSLC1 in oncogenesis、2009年12月9、10日、台湾、台北市

④ 村上善則、細胞接着分子CADM1/TSLC1の異常による肺腫瘍形成の分子機構、第67回日本癌学会総会、2008年10月30日、名古屋国際会議場

⑤ 村上善則、がん抑制遺伝子CADM1/TSLC1に

よる肺がん抑制機構の解析、第 23 回日本肺
癌学会ワークショップ、2008 年 7 月 19 日、
愛知県がんセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 美和子 (IWAI MIWAKO)

東京大学・医科学研究所・技術専門職員

研究者番号：50396884