

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700914

研究課題名（和文） 小細胞肺癌特異的に発現する CADM1 バリエントを分子標的とする転移抑制法の開発

研究課題名（英文） Approach for prevention of metastasis of small cell lung cancer by targeting a specific splicing isoform of CADM1

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）：

小細胞肺癌は非常に進行が早く、転移しやすい悪性度の高いがんである。その高転移能に着目し、その分子機構を解明し、転移抑制を目指すための基礎的検討を行った。この CADM1 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。更に小細胞肺癌における CADM1 の下流分子経路として PI3K 経路が関与している可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Small cell lung cancer (SCLC) is one of the most malignant cancers that metastasize to the distal organs even in its early stages. We examined the molecular mechanism underlying the malignant growth and metastasis of SCLC to identify candidate molecules targeting SCLC. The exogenous expression of CADM1 enhanced tumorigenicity of SCLC cells in nude mice, suggesting that the expression of CADM1 promotes malignant growth and metastasis of SCLC. Moreover, we found that PI3K and its downstream molecules may play roles in the malignant signaling mediated by CADM1 in SCLC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：分子生物学・生化学

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：小細胞肺癌・細胞接着因子・CADM1、スプライシングバリエント・癌転移

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌（SCLC）は早期から高い転移性を示し、一時的には抗がん剤に反応するもののすぐに治療抵抗性のがん細胞が出現し、

不幸な転帰に至る難治性腫瘍の代表である。日本では毎年15,000人以上の患者がSCLCにより死亡することから、その分子機構、特に転移と抗がん剤抵抗性の分子病理的解明に

基づく新たな対策が強く望まれている。

がんの浸潤、転移には様々な細胞接着分子が関与している。また、細胞接着分子は細胞膜上に発現することから、腫瘍特異的な発現が認められる場合には、診断標的としてのみならず、ヒト化抗体による機能阻害が直接医薬品開発に結びつく可能性を有することから、臨床応用を考える上で重要である。細胞接着分子 CADM1 は非小細胞肺癌を含む様々な上皮系のがんにおいて腫瘍抑制に関与する一方で、成人 T 細胞白血病 (ATL) 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。この CADM1 の過剰発現が上皮性腫瘍ながら白血病のように単一細胞状態で極めて高い転移性を示す SCLC でも原発性腫瘍の 35% に認められ、小細胞肺癌で見られる CADM1 分子種が正常肺や正常脳では認められない特異的なスプライシング・バリエーションであることを見出した。更に CADM1 スプライシング・バリエーションの発現が、接着非依存性増殖を示す SCLC 細胞 12 例全例で認められるが、接着依存性増殖を示す SCLC 細胞 2 例では全く認められないこと、また SCLC 細胞で siRNA により CADM1 発現を抑制するとスフェロイド様増殖が抑制されること、更には CADM1 を強制発現させた SCLC 細胞ではマウスでの腫瘍形成能が亢進することを見出している。このように CADM1 バリエーションが SCLC の悪性増殖、転移能を抑制する分子標的であることが示唆されている。

2. 研究の目的

難治性腫瘍の代表である SCLC の高転移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、がんの分子病理学的研究の大きな課題の一つである。そこで、CADM1 を介して SCLC が悪性増殖、転移能を獲得する分子機構とその抑制手段を明らかに

することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ウェスタンブロッティング解析

SCLC 細胞の細胞抽出液を準備し、各タンパクの特異的抗体を用いてその発現量を比較した。内部標準タンパク質としては GAPDH を用いた。

(2) 免疫沈降実験

予め Protein A-sepharose および正常 rabbit IgG と反応させることにより非特異的吸着を除いた SCLC 細胞の細胞抽出液を、Tiam1 もしくは Tiam2 抗体 (ネガティブコントロールとして rabbit IgG) を用いたおよび Protein A-sepharose とともに反応させ、その沈殿物を Tiam1 もしくは Tiam2 抗体、および CADM1 抗体で検出して、両者の結合の検出を試みた。

(3) 蛍光免疫染色法

カバーガラス上で培養した細胞を 4%ホルマリン溶液で固定後、TX-100 にて膜透過処理を行い、ブロッキングする。その後、1次抗体として、CADM1 抗体および Tiam1 もしくは Tiam2 抗体を用い、2次抗体には Cy3 標識抗ニワトリ IgY 抗体および Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。Zeiss 社製共焦点顕微鏡 LSM710 および蛍光顕微鏡 Axio Observer にて観察した。

(4) 細胞増殖実験

96 ウェルプレートで細胞を培養し、各濃度の PI3K 阻害剤 LY294002 加えた。72 時間後に MTS 試薬 (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay kit; プロメガ社) を加え、1 時間後に 490nm の吸光度を測定した。

4. 研究の成果

SCLC 細胞における CADM1 下流分子経路に着

目して、ATL 細胞で同定した CADM1 下流因子で RAC 活性化機能を有する Tiam1 の発現を検討した。CADM1 の発現が見られない、接着細胞性増殖を示す SCLC 細胞では Tiam1 の発現が著しく低下しており、CADM1 の発現様式との相関性が認められた (図 1A)。次に免疫沈降法により、CADM1 と Tiam1 の結合を調べたところ、その結合は認められなかった (図 1B)。更に蛍光免疫染色法を用いて、SCLC 細胞における CADM1 および Tiam1 の細胞内局在を調べたところ、共局在は認められなかったものの、Tiam1 は細胞接着面において CADM1 の直下に局在している可能性が示唆された (図 1C-E)。

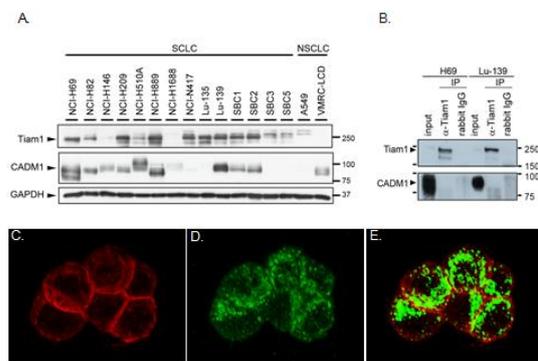


図 1. SCLC 細胞における CADM1 と Tiam1 の相関 (A) SCLC 細胞および NSCLC 細胞における CADM1 および Tiam1 の発現様式、(B) SCLC 細胞 Lysate を Tiam1 抗体で免疫沈降し、Tiam1 抗体および CADM1 抗体で検出した。(C-E) SCLC 細胞、H69 における CADM1 (赤) および Tiam1 (緑) の細胞内局在を蛍光免疫染色法にて比較した。

次に、Tiam1 の類似分子であり同様に PDZ ドメインを有する Tiam2 との相互作用を検討した。Tiam2 の発現様式は、CADM1 との相関があまり見られなかった (図 2A)。しかし、内在性に CADM1 の発現を認めない接着依存性増殖を示す SBC5 細胞株に CADM1 の 2 種のスプライシング・バリエントをそれぞれ外因性に発現させると Tiam2 の発現増強が見られた。

そこで更にこの CADM1 安定発現株に Tiam2 を外因性に発現させ、CADM1 との結合を免疫沈降法 (図 2B) および蛍光免疫染色法 (図 2C-H) にて検討を行なった。免疫沈降法では両者の結合は見られず、また蛍光免疫染色法にて細胞内局在を比較したところどちらの分子もフィロポディア様の細胞局在を示すが、明らかな共局在は認められなかった。

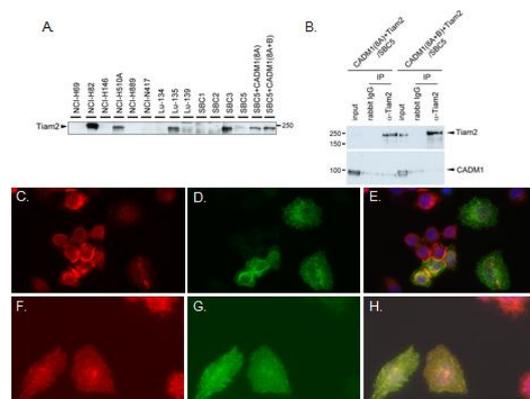


図 2. SCLC 細胞における CADM1 と Tiam2 の相関 (A) SCLC 細胞における Tiam2 の発現様式、(B) CADM1 (8A)+Tiam2/SBC5 および CADM1 (8A+B)+Tiam2/SBC5 細胞における CADM1 と Tiam2 との結合を Tiam2 抗体を用いた免疫沈降法にて検出した。(C-H) CADM1 (8A)+Tiam2/SBC5 (C-E) および CADM1 (8A+B)+Tiam2/SBC5 (F-H) における CADM1 (赤) および Tiam2 (緑) の細胞内局在を蛍光免疫染色法にて比較した。

これらの結果は、Tiam1/Tiam2 と CADM1 の相互作用を完全に否定するものではないが、SCLC 細胞においては、ATL とは異なる経路が関与している可能性が示唆された。

一方、固相化CADM1上での細胞伸展性を指標とする独自の検索法によりCADM1下流経路阻害因子として同定したPI3K阻害剤、LY294002 について、SCLC細胞の増殖に及ぼす効果をMTS法により検討した。PI3K阻害剤LY294002は、SCLC細胞において一定の増殖抑制効果を示した。更にCADM1からPI3Kに至る経路上の分子群、MPP3, Dlg, p85についても、SCLCで高発現することを見出した。しかし、PI3K阻害剤のSCLC

細胞に対する効果は、上皮細胞であるヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 およびヒト大腸がん由来細胞Caco-2でも同様に見られたことから、さらなる特異的な治療が必要であることが示唆された。

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 *Kikuchi S, *Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Masuda T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, and Murakami Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Science*, 査読有、2012、掲載確定、DOI : 10.1111/j.1349-7006.2012.02277. * equal contribution.
- ② Ito T, Williams-Nate Y, Iwai M, Tsuboi Y, Hagiyaama 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、Vol. 16(791-802) 2011、DOI : 10.1111/j.1365-2443.2011.01525.x.
- ③ 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、掲載確定、DOI: 10.1007/s12282-011-0272-7

[学会発表] (計3件)

- ① 村上善則、高橋由佳、岩井美和子、荒川敦、伊東剛、櫻井美佳、伊藤彰彦、後藤明輝、伊東紀子、江見充、齋藤光江、霞富士雄、乳がんの進展、再発に関わる細胞接着因子 CADM1、並びに新規分子標的の解析、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場
- ② 川合剛人、後藤明輝、岩井美和子、永田政義、森川鉄平、久米春喜、深山正久、本間之夫、村上善則、膀胱癌における細胞接着分子 CADM1、および CADM4 の異常、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場
- ③ 村上善則、永田政義、櫻井美佳、川合剛人、坪井裕見、岩井美和子、増田真里、後藤明輝、Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1/TSLC, in oncogenesis. The 3rd CREST-SBM International Conference: Mathematical Methods in Cancer Cell Biology, 2011年6月9日、広島大学

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