

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 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：2011～2012

課題番号：23790391

研究課題名（和文）大腸癌におけるがん抑制遺伝子 CADM1 による Src 経路の抑制機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation of c-Src pathway

研究代表者

坪井 裕見 (TSUBOI YUMI)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：80584226

研究成果の概要（和文）：細胞接着分子 CADM1 の細胞内結合因子を免疫沈降・質量分析法を用いて探索した結果、c-Src による腫瘍形成を抑制する分子である Cbp を見出した。大腸癌細胞株を用いて CADM1 が c-Src 経路を抑制する分子機構について検討を行った結果、CADM1 が細胞膜ラフトにおいて Cbp 及び c-Src と複合体を形成することにより Cbp 依存的な c-Src の不活性化を促進し、c-Src を介した腫瘍形成を抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate additional functions of CADM1 in the epithelial cell membrane, we adopted a proteomic approach and identified Csk-binding protein (Cbp), which suppress c-Src mediated transformation and tumorigenesis. We found that CADM1 formed a protein complex with Cbp and c-Src in lipid raft fractions, and suggested to promote c-Src inactivation in a Cbp-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

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

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループが非小細胞肺癌の抑制遺伝子として同定した CADM1/TSLC1 は、一回膜貫通型の糖タンパク質で、細胞の接着面および上皮細胞の側面に局在し、細胞接着に関与する。そのため、CADM1 欠失による細胞接着の破綻ががんの浸潤、転移に関わると考えられている。これまでに申請者らは、CADM1 がその細胞内領域を介してアクチン結合タンパク質、細胞膜の裏打ちタンパク質や受容体分子の局在化に関わるアダプター分子と複合体を形成することを見出しており、CADM1 が細胞膜上での受容体分子の集積や安定化に関わることが示唆された。

近年、細胞接着分子が細胞間の結合に関わる

だけでなく、増殖因子受容体やチロシンキナーゼ経路などのシグナル伝達分子をリクルートして細胞の運動や増殖を制御するという新しい機構が見つかりつつある。そして両者のクロストークが生理的には器官形成や創傷治癒の過程に重要な役割を果たし、一方でその破綻ががんの浸潤、転移につながると考えられている。以上のことから、CADM1 が上皮細胞において様々な受容体分子等と複合体を形成することにより、これらの分子の細胞膜上での局在化や安定化に寄与し、その結果、がんの発生および浸潤、転移を抑制することが示唆された。

そこで申請者らは、CADM1 と細胞膜上で複合体を形成する受容体分子や下流分子経路を明らかにするため、CADM1 結合タンパク質を

網羅的に同定することを目指し、免疫沈降法及び質量分析計を用いた解析を行った。その結果、細胞膜ラフトに局在し c-Src による腫瘍形成を抑制することでがん抑制タンパク質として機能することが報告されている Cbp/PAG1 を同定した。

非受容体型のチロシンキナーゼである c-Src は、ヒトのがんにおいては遺伝子の変異がほとんどみられないが、がんの進行に伴って発現量や活性が増加して悪性転換を誘発することができ、多くの癌、特に大腸癌や乳癌でしばしば過剰発現している。

申請者らは c-Src の活性が高い大腸癌細胞において、CADM1 の発現が Cbp と同様に大きく低下していることを見出し、CADM1 による c-Src 抑制機構の存在が示唆された。

## 2. 研究の目的

細胞接着分子と増殖因子受容体やチロシンキナーゼ経路とのクロストークの破綻ががんの浸潤、転移につながると考えられている。申請者らは大腸癌細胞において CADM1 と CADM1 結合因子として同定した Cbp が c-Src と逆相関の発現を示すことから、CADM1 が Cbp を介して c-Src の不活性化に重要な役割を果たしていると考えた。そこで CADM1 が c-Src 経路を抑制する分子機構の解明を目指し、以下の2つの課題について検討した。

(1) 上皮細胞における CADM1 と Cbp-Src 複合体との機能的相関の解析

(2) CADM1 による c-Src を介した腫瘍形成の抑制機構の解析

## 3. 研究の方法

(1) CADM1 と Cbp-Src 複合体との機能的相関の解析：細胞膜ラフト画分はショ糖密度勾配遠心法により調製した。CADM1 と Cbp、c-Src との複合体形成の有無は免疫沈降・ウェスタンブロット法により検討した。c-Src の活性化は、超遠心法により調製した細胞膜画分における c-Src の Tyr 残基のリン酸化を指標に検討した。

(2) CADM1 による c-Src を介した腫瘍形成の抑制機構の解析：CADM1 あるいは CADM1 と Cbp の両者を恒常発現する大腸癌細胞のクローンを単離し、ヌードマウス皮下に移植して、腫瘍形成の抑制効果を検討した。

## 4. 研究成果

CADM1 による c-Src 経路抑制機構の解明を目指した研究を行い、以下の結果を得た。

(1) CADM1 と Cbp-Src 複合体との機能的相関の解析：ショ糖密度勾配遠心法により細胞膜ラフト画分を分画した結果、CADM1 が Cbp・c-Src と同様に細胞膜ラフトに局在することが示された。そこで、細胞膜ラフト画分を可溶化して免疫沈降を行った結果、CADM1 が細胞膜

ラフトにおいて Cbp・c-Src と複合体を形成することを見出した。また、大腸癌細胞株を用いて c-Src の活性化を比較した結果、CADM1・Cbp を恒常発現した細胞では c-Src の活性化が抑制された。一方、siRNA 導入により CADM1・Cbp の発現を抑制した細胞では c-Src の活性化が増強された。よって、CADM1 は細胞膜ラフトにおいて Cbp・c-Src と複合体を形成することにより、Cbp を介した c-Src の不活性化を促進することが示唆された。

(2) CADM1 による c-Src を介した腫瘍形成の抑制機構の解析：ヌードマウスへの皮下移植実験の結果、Cbp 発現細胞で腫瘍形成の抑制が観察され、Cbp・CADM1 共発現細胞では抑制効果が増強された。よって、CADM1 が Cbp を介して c-Src による腫瘍形成を抑制す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2件)

① Ito T, Williams-Nate Y, Iwai M, Tsuboi Y, Hagiwara 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 Cells*. 16(7):791-802, 2011.

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01525

② Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Maruyama T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, Murakami Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 103(6):1051-1057, 2012.

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02277

[学会発表] (計6件)

① Murakami Y, Nagata M, Sakurai-Yageta M, Kawai T, Tsuboi Y, Iwai M, Masuda M, Goto A. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1/TSLC1, in oncogenesis. The 3<sup>rd</sup> CREST-SBM International Conference: Mathematical Methods in Cancer Cell Biology (広島市、2011年6月)

② Tsuboi Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ito A, Murakami Y. Analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation of c-Src pathway. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (横浜市、2011年12月)

③ Tsuboi Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ito A, Murakami Y. Analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation of c-Src pathway. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting

of the Molecular Biology Society of Japan  
(福岡市、2012年12月)

④Nakaoka H, Tsuboi Y, Sakurai-Yageta M,  
Maruyama T, Matsubara D, Murakami Y.  
Analysis of a mechanism to stabilize tumor  
suppressor protein CADM1. The 35<sup>th</sup> Annual  
Meeting of the Molecular Biology Society  
of Japan (福岡市、2012年12月)

⑤Tsuboi Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ito A,  
Murakami Y. Analysis of cell adhesion  
molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation  
of c-Src pathway. 19<sup>th</sup> International  
Charles Heidelberger Symposium on Cancer  
Research (鹿児島市、2013年2月)

⑥ Ito T, Kuwano H, Sakurai-Yageta M,  
Tsuboi Y, Matsubara D, Murakami Y. Roles  
of a cell adhesion molecule CADM1 in  
malignant progression of non-small cell  
lung cancer. 19<sup>th</sup> International Charles  
Heidelberger Symposium on Cancer Research  
(鹿児島市、2013年2月)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坪井 裕見 (TSUBOI YUMI)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号: 80584226

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: