

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290051

研究課題名(和文)細胞コンテキスト依存的細胞接着分子機能の解析に基づく、固形がんの個性診断法の開発

研究課題名(英文) Analysis of cell-context dependent features of adhesion molecules for cancer diagnosis

研究代表者

村上 善則 (MURAKAMI, Yoshinori)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30182108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：増殖因子HGFの受容体METは、様々ながんで遺伝子増幅、過剰発現等の活性化により、がん遺伝子として作用し、がん細胞の増殖や上皮間葉転換、薬剤抵抗性の獲得を促進する。申請者らは、細胞接着分子CADM1が細胞膜ラフト上でMETと複合体を形成し、そのシグナルを抑制することを見出した。さらに、CADM1は多くのがんで不活化していることから、METが活性化しCADM1が不活化したある種のがん細胞において、CADM1を実験的に導入、発現させることによりMETシグナルを抑制し、がん細胞の分子標的薬剤感受性が回復することを見出した。CADM1は、がん細胞の分子標的耐性を克服する新たな分子標的と考えられる。

研究成果の概要(英文)：MET is a receptor of HGF growth factor and is activated by gene amplification and/or overexpression in various cancer to promote cell growth, epithelial to mesenchymal transition, and resistance to molecular targeting drugs. We have demonstrated that a cell adhesion molecule, CADM1, forms a complex with MET on the raft of the cell membrane and suppresses the MET signaling. CADM1 is known to be often inactivated in various cancer cells. We have also shown that the sensitivity of cancer cells to molecular targeting drugs related to MET is restored by induction of CADM1 expression. CADM1 could provide a molecular target to overcome the resistance of cancer cells to a subset of molecular targeting drugs.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：分子標的薬 薬剤耐性 肺線がん EGFR-TKI

1. 研究開始当初の背景

細胞接着分子CADM1は、多くのがんで進展に伴い不活化し、がん抑制遺伝子として働く。その分子機構を解明する目的で、申請者らはCADM1と増殖因子HGFの受容体である MET との、細胞膜上でのクロストークを見出した。即ち、CADM1 はMET と複合体を形成し、HGF による MET のリン酸化を抑制する。一方、ヒト肺腺がんでは、CADM1 の発現欠如例に MET リン酸化が多く認められ、また CADM1 遺伝子欠損マウスに生じた肺腺がんではMET の活性化例が多い。さらに、申請者らは以前、HGFによって惹起されるイヌ腎細胞 MDCKの上皮間葉転換をCADM1が抑制することを報告し、CADM1がMET シグナル伝達経路とクロストークする可能性を示唆している。

ところで、EGFR 変異をもつ肺腺がんはEGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) が著効を示すが、1 - 数年以内に EGFR の第2の変異や MET の遺伝子増幅など新たな遺伝子異常が生じて治療抵抗性となることが知られている。その分子機構として、EGFR の2次性突然変異と、MET の遺伝子増幅が知られている。

2. 研究の目的

本研究では、CADM1 などの細胞膜タンパク質の導入による、EGFR-TKI 耐性克服の可能性を検討した。

3. 研究の方法

EGFR-TKI 耐性肺腺がん細胞の中で、EGFR遺伝子の第2の変異 (T790M変異) を有する細胞としてPC9-ZD を、またMET遺伝子増幅を示す細胞としてHCT827GR5, HCC827GR6 を各々その親株の細胞であるEGFR-TKI感受性肺腺がん細胞とともに用いた。CADM1, MET, EGFR の発現やリン酸化は、それぞれ特異的抗体によるWestern Blotting により検出した。EGFR-TKI耐性は、培養細胞に様々な濃

度の Gefitinib を加えて生存細胞数を計測して求めた。CADM1導入は、プラスミドに導入による複数の安定発現株の樹立、ドキシサイクリンによるCADM1発現誘導細胞の樹立によって行った。さらにCADM1発現アデノウイルスによる遺伝子発現導入を準備した。

4. 研究成果

申請者らは、Met遺伝子増幅を示すEGFR-TKI耐性肺腺がん細胞に、細胞接着分子群をプラスミドにより安定発現させたところ、膜分子の1つが、肺腺がん細胞のEGFR-TKIによる感受性を *in vitro* で回復することを示した。また、ヌードマウス皮下の移植腫瘍形成を抑制することを見出した。この腫瘍抑制作用は、膜分子単独でも部分的に認められたが、膜分子を発現させ、これにEGFR-TKIを加えることによって、強く認められた。抑制された腫瘍組織では、Ki-67の発現抑制が免疫組織染色にて確認された。次に、ドキシサイクリンによる膜分子誘導系を用いて解析したところ、ドキシサイクリンを加えて膜分子を誘導し、EGFR-TKIを加えた群においてのみ、*in vitro* での感受性回復が認められた。さらに、これらの細胞をヌードマウス皮下に注射して、腫瘍体積が200mm³となった時点で、ドキシサイクリン、並びにEGFR-TKIを加えると、両者を加えた場合にのみ、腫瘍の著名な増殖抑制が認められた。この場合も、増殖抑制を示した腫瘍では、ki-67の発現が抑制されていることが免疫組織染色により明らかになった。これに対し、EGFRの第2の変異であるT790M変異を示す肺腺がん細胞に同様の膜分子を導入した系では、EGFR-TKIの感受性の回復は認められなかった。

EGFR-TKI耐性の克服は、肺腺がんの臨床現場で極めて重要な問題である。新規のEGFR-TKIや、MET-TKIが試作されているが、

MET-TKIは現在のところ、それほど強力ではない結果が出ている。そこで、従来のTKI阻害剤とは全く異なる耐性克服機構の解明が必要とされる。本研究成果は、この可能性を示している。さらに、細胞接着分子と増殖因子受容体とが、細胞膜ラフとで相互作用を示し、しばしば増殖因子シグナルを抑制することから、他のTKを標的とする分子標的薬剤の作用増強や耐性克服にも応用できる可能性が示唆される。今後、この候補細胞膜タンパク質を発現するアデノウイルスベクターを作成して、EGFR-TKI 耐性細胞に導入し、*in vitro*, *in vivo* で、耐性克服が可能かどうかを検討する実験的治療系の確立を目指す。

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6件)

1. Nakaoka H, Hara T, Yoshino S, Kanamori A, Matsui Y, Shimamura T, Sato H, Murakami Y, Seiki M, Sakamoto T. NECAB3 promotes activation of hypoxia-inducible factor-1 during normoxia and enhances tumorigenicity of cancer cells. *Scientific Reports*, 6, 22784, 2016.
2. Takeuchi A, Badr MESG, Miyauchi K, Ishihara C, Onishi R, Guo Z, Sasaki Y, Ike H, Takumi A, Tsuji NM, Murakami Y, Katakai T, Kubo M, Saito T. CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J Exp Med*, 213, 123-138., 2016.
3. Akashi K, Ebihara Y, Omura G, Saito Y, Yoshida M, Ando M, Asakage T, Yamasoba T, Murakami Y. Frequent Copy Gain of the *MET* Gene in Hypopharyngeal and Laryngeal Cancer in the Japanese Population. *J Cancer Therapy*, 6, 1093-1102, 2015.
4. Fujiyuki T, Yoneda M, Amagai Y, Obayashi K, Ikeda F, Shoji K, Murakami Y, Sato H, Kai C. A measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule shows anti-tumor activity against lung cancer cells. *Oncotarget*, 6, 24895-24903, 2015.
5. Kogai H, Kikuchi S, Obana T, Tsuboi Y, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Asamura H, Kanai Y, Murakami Y. Promoter methylation of the *CADM1* and *4.1B* genes occurs independently of the *EGFR* or the *KRAS2* mutation in non-small cell lung cancer. *J Cancer Therapy*, 6, 273-285, 2015.
6. Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Suzuki T, Ichikawa K, Murakami Y. Dynamic Regulation of a Cell Adhesion Protein Complex Including *CADM1* by Combinatorial Analysis of FRAP with Exponential Curve-fitting. *PLoS ONE*, 10(3), e0116637, 2015.

[学会発表](計15件)

1. Ito T, Sakurai-Yageta M, Tsuchiya T, Kawasaki S, Ohba M, Ichikawa K, Suzuki T, Murakami Y. Mathematical analysis of the dynamics of *CADM1* and its role in the MET-driven resistance against EGFR-TKI in lung adenocarcinoma. The First JSPS Core-to-Core Seminar: Establishing Research Network of Mathematical Oncology. Nara, JAPAN, March 10, 2016.
2. Ito T, Tsuchiya T, Kumagai Y, Tsuboi Y, Sakurai-Yageta M, Oba M and Murakami Y. Dual roles of a Cell Adhesion Molecule *CADM1* in Oncogenesis. The 10th AACR-JCA

- Joint Symposium of Cancer Research. Maui, HI, USA, February 19, 2016.
3. Ito T, Nagata M, Kawai T, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Matsubara D, Murakami Y. Analysis of the role of CADM1 in suppression of lung cancer using Cadm1-deficient mice. AACR Annual Meeting 2015. Philadelphia, PA, USA, April 20, 2015.
 4. 栗野 睦美、藤幸 知子、雨貝 陽介、庄司 統一郎、村上 善則、古川 洋一、米田 美佐子、甲斐 知恵子. PVRL4 発現すい臓がん細胞株に対する腫瘍溶解性組み換え麻疹ウィルスの抗腫瘍効果解析. 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015/10/9
 5. 熊谷 友紀、伊東 剛、永田 政義、川合 剛人、丸山 智子、櫻井(八下田) 美佳、後藤 明輝、松原 大祐、村上 善則. 肺腺がん細胞の実験的転移系を用いた転移関連分子の同定と機能解析. 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015/10/9
 6. 平田 真、鎌谷 洋一郎、玉腰 暁子、山縣 然太郎、清原 裕、村上 善則、古川 洋一、中村 裕輔、久保 充明、松田 浩一. バイオバンクジャパン コホートプロファイル:47 疾患 20 万人の大規模コホートデータ. 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015/10/9
 7. 醍醐 佳代、高野 淳、フナーマンタン、吉武 義泰、篠原 正徳、藤内 祝、前川 二郎、村上 善則、醍醐 弥太郎. 口腔癌の新規バイオマーカー及び治療標的分子である UROC4 の機能解析. 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015/10/9
 8. Matsubara D, Ito T, Tanaka I, Ishikawa S, Goto Y, Nakano T, Dobashi Y, Nakajima J, Endo S, Fukayama M, Sekido Y, Niki T, and Murakami Y. Loss of YAP1 defines neuroendocrine differentiation of lung tumor. The 74th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Nagoya, October 9, 2015.
 9. Murakami Y, Ito T, Kogai H, Sakurai-Yageta M, Kumagai Y, Matsubara D. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in apoptosis induction, invasion and metastasis. The 74th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Symposium, Nagoya, October 8, 2015.
 10. Phung TM, Takano A, Yoshitake Y, Murakami Y, Shinohara M, Daigo Y. Characterization of UROC2 protein as a prognostic biomarker and a therapeutic target for oral cancer. The 74th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Symposium, Nagoya, October 8, 2015.
 11. Murakami Y, Matsuda K, Kubo M. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in apoptosis induction, invasion and metastasis. 東京大学ゲノム医科学研究機構キックオフ・シンポジウム 東京都 2015 年 8 月 29 日
 12. 村上 善則 細胞接着分子 CDAM1 のダイナミクス. 実験数理細胞シミュレーション・シンポジウム 東京都 2015 年 8 月 6 日.
 13. Tsuboi Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ito A, Murakami Y. Roles of cell adhesion molecule 1 (CADM1) in Cbp-dependent inactivation of c-Src pathway. BMB2015 Biochemistry and Molecular Biology, Kobe, December 1, 2015
 14. Saitoh A, Sakurai-Yageta M, Ichikawa

K, Murakami Y. FRAP Analysis of cell adhesion protein complex including CADM1. The 74th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Nagoya, October 9, 2015.

15. Shiu S-J, Matsubara D, Morikawa T, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami M. The role of RAPGEF2 in CADM1-positive high-grade lung adenocarcinoma. The 74th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Nagoya, October 9, 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上善則 (MURAKAMI, Yoshinori)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30182108

(2) 研究分担者

後藤明輝 (GOTO, Akiteru)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90317090

(2) 研究分担者

松原大祐 (MATSUBARA, Daisuke)

(H27.5.31.まで)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号：80415554

(3) 研究分担者

櫻井美佳 (SAKURAI, Mika)

(H25.8.31.まで)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80508359