

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：2009～2011

課題番号：21790309

研究課題名（和文）Ig様接着分子CADM1による細胞間接着と浸潤における動態と下流分子経路の解明

研究課題名（英文）The dynamic regulation of an Ig-like cell adhesion molecule, CADM1 in cell adhesion and invasion

研究代表者

櫻井 美佳 (SAKURAI MIKA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80509359

研究成果の概要（和文）：細胞接着分子 CADM1 は、上皮細胞では細胞骨格に連結する複合体を形成し接着形成・維持に働いている。そこで上皮細胞における CADM1 の動的制御を、蛍光蛋白質を用いて解析した結果、CADM1 および複合体構成分子は、たえず結合・解離を繰り返して接着維持に働くことが示唆された。一方、成人 T 細胞白血病細胞に発現する CADM1 は、浸潤突起様の構造の形成を介して、その内皮下浸潤に関与することが考えられた。

研究成果の概要（英文）：A cell adhesion molecule, CADM1, is involved in the formation and maintenance of epithelial cell adhesion by interacting with actin-binding proteins. By analyzing the dynamic regulation of CADM1 complex using fluorescence-tagged molecules, CADM1 complex was found to be exchanged continuously in confluent cells. In contrast, in adult T-cell leukemia (ATL), CADM1 played a role in trans-endothelial migration through the formation of the protrusion at the attachment sites of ATL and endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：細胞接着、CADM1、動的制御、FRAP 法

1. 研究開始当初の背景

CADM1/TSLOC1は、肺非小細胞がんの抑制遺伝子として同定された遺伝子である。正常組織ではCADM1は肺・腎臓などの上皮細胞に

発現し、カルシウム非依存性の細胞間接着分子として、隣接する細胞のCADM1とホモフィリックに結合し細胞間接着を形成する。さらにCADM1はその細胞内領域で、細胞膜の

裏打ち蛋白質であるprotein 4.1やアダプター分子群MAGuKと結合し、アクチン細胞骨格系に連結する。これらの細胞にCADM1に対するsiRNAを導入すると細胞間接着が未成熟になることからCADM1は上皮様形態形成に必須であると考えられる。さらに様々な癌細胞で癌の悪性度に比例してCADM1の発現抑制が見られ、そのような癌細胞にCADM1を発現させると癌化や転移が抑えられることから癌抑制蛋白質として機能することが示唆されている。

一方、血球系の細胞は通常CADM1を発現しないが、ATL細胞ではCADM1を高発現することが見出された。ATL細胞は、CADM1を発現しない血管内皮細胞に接着することから、ATL細胞上のCADM1と血管内皮細胞や細胞外基質の他の膜分子とがヘテロフィリックに結合することが、ATL細胞の運動・浸潤性に重要であると考えられている。これらのことから、ATL細胞に異所性に発現するCADM1とその下流の経路は診断および治療の標的になると考えられる。しかし、なぜCADM1が細胞の種類によって、このような2つの異なる機能を発揮するのか、その機構は明らかになっていない。

2. 研究の目的

上述のようにCADM1による接着は、形態形成・維持あるいは細胞浸潤という二つの異なる現象を誘導し癌化の抑制および促進に寄与するが、接着時の動的制御や下流で活性化されるシグナル伝達経路などの分子機構は明らかになっていない。そこで本研究では、CADM1によるホモ・ヘテロフィリックそれぞれの細胞接着について以下に述べる3点を明らかにすることを目的とした。

(1) 上皮細胞の接着形成・維持におけるCADM1の動態と下流分子経路の解明

上皮細胞同士が接触すると、細胞骨格制御シグナル伝達経路(Rho GTPases, PI3K など)が

活性化され、アクチンの再構成や細胞の収縮などが起こり細胞-細胞間接着が形成される。形成された接着・形態維持は、細胞浸潤の抑制のみならず接触障害(contact inhibition)による細胞増殖の抑制に重要である。CADM1は接着の初期からその接着面に局在するが、その詳細な動態および下流のシグナル分子は未解明である。そこで従来の分子細胞生物学的手法と生細胞イメージングとを組み合わせることにより、CADM1の動態の時間・空間的な制御機構を同時に明らかにしようと考えた。さらに形成された接着は一見すると静的だが、その維持のために絶えず接着分子や細胞骨格分子の入れ替わりが起きている。そこで接着部位におけるCADM1とprotein 4.1-MAGuK-アクチン細胞骨格との結合が互いの動態制御や接着維持に関与するかどうか検討し、CADM1系の接着維持における意義を明らかにする。

(2) ATL細胞の浸潤におけるCADM1の動態と下流分子経路の解明

ATL細胞は、血管内皮細胞や細胞外基質に接着し浸潤する。一方、高浸潤性の癌細胞を細胞外基質上で培養すると浸潤突起(invadopodia)と呼ばれる細胞骨格や蛋白質分解酵素などを含む細胞膜の突起構造が形成され、細胞外基質の局所的な分解が起こる。生体内で細胞が細胞外基質の中を運動し浸潤するためには細胞運動と運動の方向に沿った局所的な細胞外基質の分解が必要であることから、浸潤突起の形成機構およびその機能の解析は細胞浸潤能を調べる有用な系である。この方法はこれまで乳癌、黒色腫由来細胞など一部の癌細胞でのみでしか行われてこなかったが、この系を発展させ、ATL細胞に発現するCADM1が浸潤突起形成に必要なかまたその動態を生細胞イメージングにより明らかにする。

(3) CADM1による細胞間接着の意義の統合的理解

上述の研究より明らかになった、上皮とATL細胞におけるCADM1を介する細胞間接着の実態の比較により、細胞間接着の生理的機能、さらに癌化における意義の統合的理解を図る。

3. 研究の方法

(1) 上皮細胞の接着形成・維持におけるCADM1の動態と下流分子経路の解明

接着形成時のCADM1の挙動を調べるため、タイムラプス法によりその動態を可視化する。イヌ腎臓由来上皮細胞株のMDCKに、蛍光蛋白質YFPとの融合蛋白質としてCADM1を恒常的に発現するクローンを作成した (MDCK/CADM1-YFP)。この細胞を低密度で培養し細胞接着形成とその後に起こるシート状の形態形成、あるいはシート状に培養した細胞に傷をつけそこから細胞間接着の回復を見る創傷治癒時における細胞の形態変化およびCADM1の動態を観察する。

また、CADM1による細胞間接着により特異的に活性化される下流のシグナル伝達経路を解析するためにcell spreading法を確立した。この方法は、免疫グロブリンFc受容体との融合タンパク質としてヒト胎児腎臓由来細胞HEK293から精製したCADM1の細胞外ドメイン(CADM1-EC-Fc)をカバーガラスに固相化し、その上でMDCK/CADM1-GFP細胞を培養し、その形態変化(spreading)を附着細胞の面積から定量化するものである。陰性対照としてMDCK細胞をCADM1-EC-Fc上で培養したものや、MDCK/CADM1-YFP細胞をヒトIgG上で培養したものに比べて、その面積が約2倍になっていることから、CADM1特異的な接着が細胞の形態変化(spreading)を誘導することが示された。この系を利用し、MDCK/CADM1-YFP細胞をCADM1-EC-Fc上で培養するとき各種シグナル分子 (アクチン細胞骨格、細胞増殖およびインテグリンシグナル経路など) の阻害剤を加え、spreading

を抑制する阻害剤を見つけることで、CADM1の接着により活性化されるシグナル伝達経路を探索する。予備的な実験から、アクチン重合阻害剤を加えた場合に、MDCK/CADM1-YFP細胞が基質への接着は示すものの形態変化が阻害され、CADM1の下流経路 (CADM1-protein 4.1-アクチン)の阻害剤の検索に spreading 法が有効であることを確認している。

さらに、接着の維持におけるCADM1の動態はFRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)法を用いて検討する。FRAP法では接着面に局在するCADM1-YFPに強い蛍光を当て一度退色させ、そこからの回復を見ることで入れ替わりの速さを調べることができる。またFLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching)法を用いてCADM1の輸送路と考えられる領域 (細胞質、接着面の一部など) でYFPを退色し続け、接着面のCADM1-YFPの蛍光量の減少を観察し、その輸送経路を明らかにする。さらにCADM1のどの領域が接着の形成や維持に必要なかを調べるために、CADM1の欠変異体とYFPとの融合蛋白質をMDCK細胞に発現させ、接着形成への影響を見ると同時に、FRAP/FLIP法でそれらの分子の動きを観察する。さらにその細胞に結合分子 (protein 4.1、アクチンなど) をYFPとの融合蛋白質として同時に発現させ同様の解析を行い、両者の結合が接着の形成と維持に必要なかを検討する。

(2) ATL細胞の浸潤におけるCADM1の動態と下流分子経路の解明

蛍光標識した細胞外基質を固相化したカバーガラスの上で癌細胞を培養し、浸潤突起と基質の分解を同時に可視・定量化するマトリックス分解法が確立されている。これをATL細胞にも応用し、細胞外基質および血管内皮細胞への浸潤突起の形成にCADM1が必要であるか、CADM1の機能を阻害する単ク

ローン抗体あるいは、CADM1 に対する siRNA を処理した細胞で同様の実験を行うことにより検討する。

(3) CADM1による細胞接着の機能の統合的理解

上述の研究より明らかになった、上皮とATL細胞におけるCADM1を介する細胞間接着の実態と意義の比較により、細胞間接着の生理的機能、さらに癌化における意義の統合的理解を図る。

4. 研究成果

(1) 上皮細胞の接着形成・維持におけるCADM1の動態と下流分子経路の解明

接着形成時におけるCADM1-YFPの挙動をE-cadherin-GFPと比較して調べたところ、初めはそれぞれ独立した突起状の接着を形成し、接着形成に伴い両者が同じ接着面に共局在することが示された。またCADM1の欠失変異体を用いた免疫沈降法により、接着形成時にCADM1が細胞内領域を介してE-cadherinと結合することが示唆された。

また、CADM1の接着の下流で特異的に活性化されるシグナル伝達経路を明らかにするために、我々の研究室で確立したcell spreading法を用いて、CADM1によるホモフィリックな接着を特異的に阻害する低分子化合物のスクリーニングを行った。その結果、PI3キナーゼ阻害剤によりcell spreadingが有意に抑制されることを見出した。さらに、このときPI3キナーゼの下流分子であるAktが活性化されていること、およびGFP-Akt-PHがspreadした細胞の辺縁部に局在することが示され、CADM1のシグナル伝達の下流経路の一つでPI3キナーゼが活性化されることが明らかになった。このことからCADM1による細胞間接着形成・維持にPI3キナーゼが重要であることが示唆された。

さらに、シート状に培養した細胞を用いて接着維持におけるCADM1の動態を調べる目

的 で FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 法を用いた解析を行った。その結果、細胞骨格の構成分子であるGFP-actinは数秒でそのほとんどが入れ替わるのに対して、CADM1-YFPはその約50%が数分のうちに入れ替わり、残りの分子は安定して接着面に局在することが示された (図1)。

また、細胞内領域の protein 4.1 および MAGuKs 結合領域に点変異を持つCADM1を用いて同様の解析を行ったところ、約80%の分子が数分のうちに入れ替わり、その動態が亢進していることが分かった。このことからCADM1の接着面における安定した局在に、細胞内領域の裏打ち蛋白質を介した細胞骨格への連結が必要であることが示唆された。またFLIP(Fluorescence Loss in Photobleaching)法を用いてCADM1の輸送路と考えられる領域においてCADM1-YFPを退色し続けた結果、CADM1は細胞内から接着面に移動するよりむしろ接着面内を主に移動することが示された。これらの結果から、安定した接着面においてもCADM1は常に動的であり、このことが接着の維持に重要である可能性が示唆された。

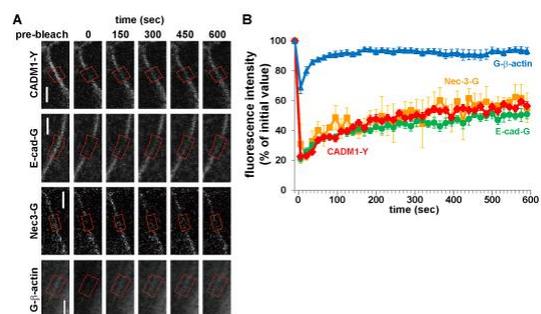


図1、細胞接着分子のFRAP解析(A)赤枠内を退色させたときの蛍光輝度の経時変化. (B)蛍光輝度値の定量解析.

さらに、CADM1の細胞内領域に形成される複合体の安定性を調べる目的で、

CADM1の細胞内領域に結合する裏打ち蛋白質群であるprotein 4.1BおよびMPP3の動態を解析した。すると予想に反して、これらの結合分子はCADM1よりも動的であることが示された(図2)。またFLIP(Fluorescence Loss in Photobleaching)法を用いて、これらの分子の輸送路と考えられる領域を退色し続けた結果、CADM1, 4.1B, MPP3はいずれも細胞内から接着面に移動するよりも、むしろ接着面の細胞膜あるいは細胞膜直下を主に移動することが示された。

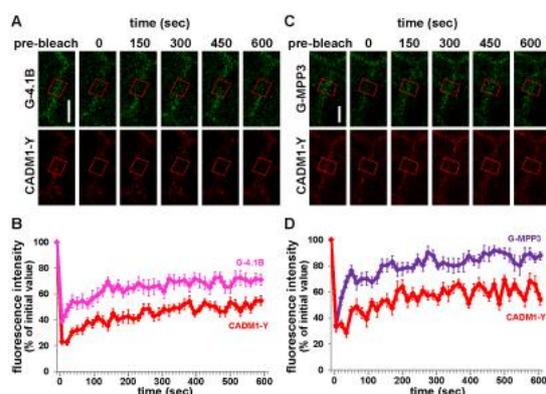


図2、CADM1結合分子4.1B, MPP3のFRAP解析. (A,C)赤枠内を退色させたときの蛍光輝度の経時変化. (B,D)蛍光輝度値の定量解析.

これらの結果から、安定した接着面においてもCADM1自身およびその複合体は常に動的であり、多くが入れ替わりながら接着を維持していることが明らかになった。またprotein 4.1およびMAGuKsは、接着面の細胞膜直下での入れ替わりが主であることから、おそらく他の接着分子とも結合する、裏打ち蛋白質同士が結合する、あるいは細胞骨格に結合することで常に一定以上の分子が細胞膜直下に貯蔵されていると考えられる。以上の結果から、CADM1複合体は動的に制御を受け、細胞間接着の維持に寄与することが示唆された。

(2) ATL細胞の浸潤におけるCADM1の動態と下流分子経路の解明

CADM1を高発現しかつ浸潤性を示すATL

などのがん細胞を細胞外基質上で培養し、浸潤突起(invadopodia)におけるCADM1の局在を観察したところ、CADM1の浸潤突起の先端部への蓄積は見られなかった。一方で、CADM1をほとんど発現しない血管内皮細胞(HUVEC)上にATL細胞を培養する血管浸潤モデルにおいて、ATL細胞は内皮細胞を通過する浸潤性を示したが、このとき2つの細胞の接着面に形成された突起状の構造にCADM1の蓄積が見られた。このことからATL細胞に発現するCADM1は細胞外基質ではなく、他の細胞との接着を通じて細胞浸潤に寄与することが示唆された。

さらにATL細胞の血管内皮下浸潤において、CADM1が細胞の先端に発現することが示された。そこでこの浸潤におけるCADM1の動態を調べるために、タイムラプス法によりATL細胞の浸潤を解析する系を確立した。その結果、炎症時の白血球の血管外流出の過程で見られる内皮細胞間通過経路(para-経路)に類似し、ATL細胞が内皮細胞間接着の間を通過し浸潤する様子が観察され、CADM1がこの機構に関与する可能性が考えられた。

(3)CADM1による細胞接着の機能の統合的理解

これまでの研究により、上皮細胞の接着形成におけるCADM1のホモフィリックな相互作用は、PI3K経路を活性化すること、また接着形成後には、細胞膜直下でprotein 4.1, MAGuKsと動的複合体を形成してその維持に寄与することが示唆された。一方でATL細胞におけるCADM1は血管内皮細胞などに発現する分子とヘテロフィリックに結合し、浸潤突起様の構造形成ということなる形態変化を誘導することが示された。上皮細胞とATL細胞とでは、CADM1自身の動的制御、また下流のシグナル経路の違いにより、接着維持あるいは細胞浸潤という異なる機能が発揮されることが考えられた。

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 5 件)

- ① Kikuchi, S., Iwai, M., Sakurai-Yageta, M., Tsuboi, Y., Ito, T., Maruyama, T., Tsuda, H., Kanai, Y., Onizuka, M., Sato, Y. et al. (2012). Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Sci* **103**, 1051-7. 査読有
- ② Nagata, M., Sakurai-Yageta, M., Yamada, D., Goto, A., Ito, A., Fukuhara, H., Kume, H., Morikawa, T., Fukayama, M., Homma, Y. et al. (2012). Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer* **130**, 1329-37. 査読有
- ③ Ito, T., Williams-Nate, Y., Iwai, M., Tsuboi, Y., Hagiwara, M., Ito, A., Sakurai-Yageta, M. and Murakami, Y. (2011). Transcriptional regulation of the CADM1 gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells. *Genes Cells* **16**, 791-802. 査読有
- ④ Takahashi, Y., Iwai, M., Kawai, T., Arakawa, A., Ito, T., Sakurai-Yageta, M., Ito, A., Goto, A., Saito, M., Kasumi, F. et al. (2011). Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*. In press. 査読有
- ⑤ Sakurai-Yageta, M., Masuda, M., Tsuboi, Y., Ito, A. and Murakami, Y. (2009). Tumor suppressor CADM1 is involved in epithelial cell structure. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 977-82. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 櫻井 美佳, MALDI 質量分析を用いた細胞間接着分子 CADM1 の N 型糖鎖の解析, 第 59 回日本質量分析学会総合討論会, 2011 年 9 月 14 日, 大阪
- ② Sakurai-Yageta Mika, Dynamics of CADM1 protein in the membrane of stable adhesion and in the process of cell-cell contact formation, The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, 2010 年 12 月 13 日, The Pennsylvania Convention Center, U.S.A.
- ③ 櫻井 (八下田) 美佳, Dynamics of CADM1 protein in the membrane of stable adhesion and in the process of cell-cell contact formation, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日, パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 美佳 (Sakurai Mika)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号 : 80509359

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし