

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：19K16708
研究課題名(和文)細胞接着分子CADM1とトランス相互作用する分子群の同定

研究課題名(英文)Identification of trans-interacting receptors for CADM1

研究代表者

伊東 剛 (Ito, Takeshi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：20733075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞接着分子CADM1は免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)に属し、同分子種あるいはIgSFに属する異分子種と相互作用し、細胞接着に寄与する。CADM1の発現異常は様々な病態に関与し、成人T細胞白血病(ATL)に高発現するCADM1は血管内皮細胞との接着を介して臓器浸潤を亢進する。しかしながら、血管内皮細胞においてCADM1と相互作用する分子は同定されていなかった。本研究では、ATL細胞に発現するCADM1が血管内皮細胞に発現するCADM1と相互作用し、血管外遊出及び臓器浸潤を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

独自にIgSF遺伝子群をクローニングし、精製したIgSF-Fcタンパク質ライブラリーは、CADM1のみならずIgSF分子の相互作用ネットワークを解明する上で強力な技術基盤となり得る点において学術的意義がある。また、ATL細胞のCADM1を介した臓器浸潤の機序を明らかにしたことにより、中和抗体などを用いた細胞接着阻害により浸潤を抑制する新たな治療法の可能性を見出した点において社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Cell adhesion molecule 1 (CADM1), which belongs to the immunoglobulin superfamily (IgSF), contributes to cell-cell adhesion through trans-interaction with CADM1 itself or other IgSF molecules. Ectopic expression of CADM1 in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is involved in organ infiltration of ATL cells by promoting adhesion of ATL cells to vascular endothelial cells. However, the trans-interacting receptors for CADM1 on vascular endothelial cells had not been identified. In this study, we showed that homophilic interaction of CADM1 between ATL cells and vascular endothelial cells promotes extravasation and liver infiltration of ATL cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞接着

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CADM1 は免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF: immunoglobulin superfamily) に属する 1 回膜貫通型の細胞接着分子であり、主に上皮細胞に発現し上皮構造の形成及び維持に寄与する。CADM1 は非小細胞肺がんのがん抑制遺伝子として同定され、種々の浸潤がんにおいて高頻度に不活化を受けることが知られている。一方で、成人 T 細胞白血病 (ATL: adult T-cell leukemia/lymphoma) において CADM1 は異所性に高発現し、ATL 細胞と血管内皮細胞との接着を介して臓器浸潤を亢進することが示唆されている。加えて、*Cadm1* ノックアウトマウスは雄性不妊の表現型を示すが、これは精子細胞に発現する CADM1 が欠如することにより、支持細胞であるセルトリ細胞との脱接着により成熟途中で精細管管腔へ滑脱することが原因である。

CADM1 は主に隣接細胞の CADM1 とトランス-ホモ相互作用により細胞接着に寄与するが、異種分子とトランス-ヘテロ相互作用を形成する場合もあり、上皮細胞間においては Nectin-3 と、神経細胞間においては CADM2 及び CADM3 と、血中循環上皮細胞-T 細胞間においては CRTAM と相互作用することが報告されている。しかし、血管内皮細胞及びセルトリ細胞に発現する CADM1 の相互作用分子は未同定である。これらの分子群を同定することは、「成人 T 細胞白血病の臓器浸潤の亢進」及び「未成熟精子のセルトリ細胞からの滑脱による無精子症」という 2 つの病態の解明につながり、非常に有意義である。

CADM1 の相互作用分子が未同定である理由の一つは、細胞外におけるタンパク質相互作用の探索法が限られていることにある。細胞外に存在するタンパク質はジスルフィド結合や糖鎖付加などの翻訳後修飾を受けるが、酵母ツーハイブリッド法は核内でジスルフィド結合が形成されにくくタンパク質の折り畳みが細胞外とは異なり、またファージディスプレイ法では糖鎖が付加されないため適当でない場合が多い。加えて、細胞外におけるタンパク質相互作用は一般的に親和性が低く ($K_D > 1 \mu\text{M}$)、免疫沈降-質量分析法では相互作用を維持したまま細胞膜を可溶化することが難しい。したがって実験的アプローチは発現クローニング法、もしくはタンパク質ライブラリーとの相互作用スクリーニングなどに限定される。そこで本研究では、一般的に IgSF 分子は IgSF 分子同士結合し、CADM1 と相互作用する既知の分子も全て IgSF に属することから、細胞表面に局在する IgSF の細胞外領域に Fc タグを付加した IgSF-Fc タンパク質ライブラリーを作成し、CADM1 との結合を網羅的に調べることで未知の相互作用分子の同定を試みる。

2. 研究の目的

本研究は、血管内皮細胞及びセルトリ細胞に発現する CADM1 の相互作用分子を同定し、CADM1 による ATL 細胞の血管内皮細胞への接着を介した臓器浸潤の亢進、並びに精子細胞のセルトリ細胞からの滑脱による無精子症という 2 つの病態の分子機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

血管内皮細胞及びセルトリ細胞における CADM1 の結合分子を同定するために、既知の結合分子の関与を検討し、加えて IgSF タンパク質ライブラリーを用いた新規結合分子の探索を行う。さらに当該遺伝子のノックアウトマウスを用い、ATL 細胞の浸潤、精子成熟について解析する。

4. 研究成果

(1) ATL 細胞に発現する CADM1 は、血管内皮細胞の CADM1 を介して臓器浸潤を促進する

ATL は HTLV-1 レトロウイルスの感染を契機として発症する白血病である。CADM1 は血液細胞に発現を認めない一方、ATL 細胞に異所性に発現し (Sasaki et al, *Blood*, 2005)、CD7 とともに ATL 細胞のフローサイトメトリーを用いた診断に使用されている (Kobayashi et al, *Clin Cancer Res*, 2014)。CADM1 は ATL 細胞と血管内皮細胞との接着を促進し、ATL 細胞 ED-40515(-) における CADM1 の過剰発現が免疫不全 NOG マウスにおける臓器浸潤を促進することが報告されている (Dewan et al, *J Virol*, 2008)。しかし、血管内皮細胞における CADM1 の結合相手分子、また CADM1 が臓器浸潤を促進するメカニズムは不明であった。

本研究ではまず、HTLV-1 感染ヒト T 細胞である MT-2 において CADM1 をノックダウンし、NOG マウスへ尾静脈注射することにより ATL 細胞の臓器浸潤について検討した。その結果、MT-2 細胞は肝臓、肺、脾臓、骨への浸潤を認めたが、CADM1 ノックダウン細胞では各臓器への浸潤が低下した。特に浸潤細胞の割合が高かった肝臓について、尾静脈注射の翌日に解剖して摘出し、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の免疫染色を行うことで MT-2 細胞が血管の内側にあるか、肝組織内へ浸潤したかを判定した。その結果、CADM1 ノックダウン細胞は血管の内側に存在する割合が高く、CADM1 は ATL 細胞の血管外遊出を促進することが示唆された。CADM1 ノックダウン細胞は血管内皮細胞 HUVEC との接着性が低下していたことから、CADM1 は ATL 細胞と血管内皮細胞との接着性向上により血管外遊出を促進することが予想された。

そこで、ATL 細胞における CADM1 の血管内皮細胞における結合相手分子の同定を試みた。HUVEC に発現する既知の CADM1 結合分子を RT-PCR で調べたところ、CADM1、CADM4、Nectin3 の 3 種類の発現を認めた。次に、ATL 細胞は血管内皮細胞や線維芽細胞の上に重層すると細胞伸長を起こすが (Masuda et al, *J Biol Chem*, 2010)、CADM1、CADM4、Nectin3 の精製タンパク質の上に

ATL細胞株 ATN-1 を播種したところ、CADM1 及び CADM4 タンパク質上において細胞伸長が起こり、接着細胞数も多かった。したがって、血管内皮細胞に発現する CADM1 または CADM4 が ATL 細胞の CADM1 と結合している可能性が考えられた。

血管内皮細胞を含む宿主細胞における CADM1 及び CADM4 の ATL 細胞の浸潤における役割を明らかにするために、全身性の *Cadm1* 及び *Cadm4* ノックアウトマウスを用い、C57BL/6 マウス由来の T 細胞リンパ腫細胞株 EL4 に CADM1 を導入した細胞をマウス尾静脈に注射した。CADM1 の導入により、EL4 細胞の野生型 C57BL/6 マウス肝臓への浸潤が促進され、肝表面の腫瘤数が増加した。*Cadm4* ノックアウトマウスでは野生型と同等の肝浸潤が認められた一方で、*Cadm1* ノックアウトマウスでは CADM1 による肝浸潤の亢進が認められなかった。したがって、ATL 細胞の肝浸潤には宿主細胞における CADM1 が必要であることが示唆された。さらに、*Cadm1* flox マウスと *Tie2-Cre* マウスを交配して血管内皮細胞特異的 *Cadm1* ノックアウトマウスを作成し、EL4 細胞の尾静脈注射を行ったところ、全身性ノックアウトマウスと同様に CADM1 による EL4 細胞の肝浸潤亢進が認められなかった (図)。これらの結果から、ATL 細胞に発現する CADM1 は、血管内皮細胞に発現する CADM1 との相互作用を介して臓器浸潤を促進することが示された。

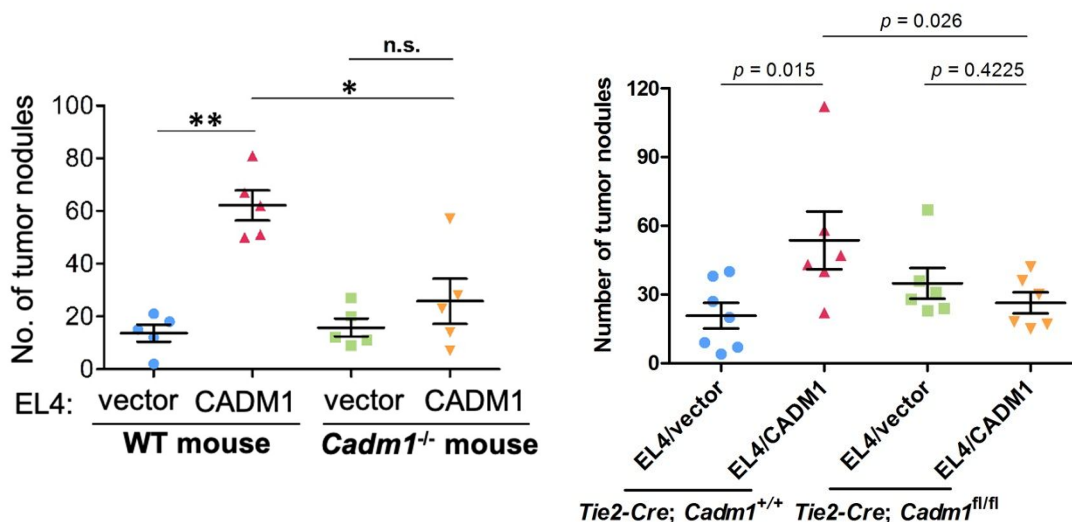


図. マウス T リンパ腫細胞 EL4 は CADM1 の導入により肝浸潤が亢進するが、*Cadm1* ノックアウトマウスでは浸潤亢進が認められない。EL4/vector 細胞及び EL4/CADM1 細胞を、全身性(左)及び血管内皮細胞特異的(右) *Cadm1* ノックアウトマウスの尾静脈に注入し、2週間後に解剖して肝臓表面の腫瘤結節数を計測した (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

(2) CADM1 の精巣特異的スプライスバリエント v8/9 および v9 は精子成熟に必須ではない

精子細胞に発現する CADM1 はセルトリ細胞との接着を担い、精子成熟に寄与することが先行研究により示されている (Yamada et al, *Mol Cell Biol*, 2006 ほか)。しかしながらセルトリ細胞において既知の CADM1 結合分子の発現は認められず、結合相手分子は不明である。一般に IgSF 分子は IgSF 分子同士結合し、CADM1 と結合する既知の分子も全て IgSF に属することから、未知の結合相手分子も IgSF に属すると予想した。そこで、細胞表面に局在する IgSF の細胞外領域に Fc タグを付加した IgSF-Fc タンパク質ライブラリーを作成し、CADM1 との結合を網羅的に調べるにより未知の相互作用分子の同定を試みた。IgSF-Fc タンパク質は FreeStyle293 細胞を用いて作成し (Ito et al, *Front Dev Cell Biol*, 2018)、合計 264 種類からなるライブラリーを作成した。FLAG タグを付加した CADM1 精製タンパク質と IgSF-Fc ライブラリーとの結合は、Alpha (amplified luminescent proximity homogeneous assay) テクノロジーを用いて、Protein A ドナービーズ及び抗 FLAG アクセプタービーズを使用してスクリーニングを行った。その結果、既知の結合分子 CADM1, CADM2, CADM3, CRTAM との結合を認めた一方で、他の分子との結合は認められず、新規の結合分子は得られなかった。

セルトリ細胞における CADM1 の結合分子が同定できなかったことから、精子細胞における CADM1 のスプライシングバリエントの機能に関する研究を進めた。*CADM1* 遺伝子は 12 個のエクソンから成り、エクソン 8 及び 9 は選択的エクソンであり、両エクソンを含まない v(-)型、エクソン 8 を含む v8 型、エクソン 9 を含む v9 型、両エクソンを含む v8/9 型の 4 種類のスプライシングバリエントが存在する。精巣では v8/9 型及び v9 型が発現するが、これらは他の正常組織では発現が認められず、精巣特異的である。そこで、精巣特異的スプライスバリエントに共通して含まれるエクソン 9 の全身性ノックアウトマウス (*Cadm1* 9 マウス)を、*Cadm1* exon 9 flox マウスと *CAG-Cre* マウスを交配することにより作成した。*Cadm1* 9 マウスの精巣では v8 型と v(-)型の両方が発現し、エクソン 9 が脱落していることを確認した。*Cadm1* 9 雄マウスの妊孕性について、野生型の雌マウスと交配したところ、仔マウスが得られた。また *Cadm1* 9 マウスの精巣には成熟精子が認められた。したがって、CADM1 の精巣特異的スプライスバリエント v8/9 及び v9 は精子成熟に必須ではなく、v8 または v(-)により代替可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ito Takeshi, Nakamura Atsuko, Tanaka Ichidai, Tsuboi Yumi, Morikawa Teppei, Nakajima Jun, Takai Daiya, Fukayama Masashi, Sekido Yoshitaka, Niki Toshiro, Matsubara Daisuke, Murakami Yoshinori	4. 巻 110
2. 論文標題 CADM1 associates with Hippo pathway core kinases; membranous co-expression of CADM1 and LATS2 in lung tumors predicts good prognosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2284 ~ 2295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 伊東剛、笠井優、村上善則	4. 巻 51
2. 論文標題 ATLにおけるCADM1の発現とその機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 513 ~ 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Fumi, Tsuboi Yumi, Takahashi Yuka, Horimoto Yoshiya, Mogushi Kaoru, Ito Takeshi, Emi Mitsuru, Matsubara Daisuke, Shibata Tatsuhiro, Saito Mitsue, Murakami Yoshinori	4. 巻 112
2. 論文標題 Short somatic alterations at the site of copy number variation in breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 444 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsubara Daisuke, Yoshimoto Taichiro, Soda Manabu, Amano Yusuke, Kihara Atsushi, Funaki Toko, Ito Takeshi, Sakuma Yuji, Shibano Tomoki, Endo Shunsuke, Hagiwara Koichi, Ishikawa Shumpei, Fukayama Masashi, Murakami Yoshinori, Mano Hiroyuki, Niki Toshiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Reciprocal expression of trefoil factor 1 and thyroid transcription factor 1 in lung adenocarcinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2183 ~ 2195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Funaki Toko, Ito Takeshi, Tanei Zen-ichi, Goto Akiteru, Niki Toshiro, Matsubara Daisuke, Murakami Yoshinori	4. 巻 534
2. 論文標題 CADM1 promotes malignant features of small-cell lung cancer by recruiting 4.1R to the plasma membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 172 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 伊東剛、笠井優、顔曉珮、熊谷友紀、村上善則
2. 発表標題 細胞接着分子CADM1は成人T細胞白血病の浸潤を促進する
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊東剛、松原大祐、田中一大、坪井裕見、高井大哉、深山正久、関戸好孝、仁木利郎、村上善則
2. 発表標題 細胞接着分子CADM1は肺腺がんにおいてMST-LATS kinase群と相互作用しHippo経路を制御する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠井優、伊東剛、村上善則
2. 発表標題 細胞接着分子CADM1は成人T細胞白血病/リンパ腫細胞の臓器浸潤を促進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船城桐子、伊東剛、村上善則
2. 発表標題 小細胞肺がんの悪性化における細胞接着分子CADM1の機能解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊東剛、岩成宏子、丸山智子、高見和孝、田中剛、長瀬隆英、浜窪隆雄、村上善則
2. 発表標題 Development of a novel tumor marker for small cell lung cancer by targeting a splicing variant of CADM1
3. 学会等名 第5回AMEDがん若手研究者ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東剛、船城桐子、種井善一、村上善則
2. 発表標題 CADM1 enhances malignant features of small-cell lung cancer
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東剛
2. 発表標題 細胞接着分子CADM1の肺がんにおける機能と診断への応用
3. 学会等名 立命館大学システム視覚科学研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東剛、永田政義、川合剛人、伊藤彰彦、後藤明輝、松原大祐、村上善則
2. 発表標題 細胞接着分子CADM1の発現欠如は肺腺がんの発生および浸潤を促進する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笠井優、伊東剛、村上善則
2. 発表標題 成人T細胞白血病/リンパ腫細胞の臓器浸潤における細胞接着分子CADM1の役割
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東侑生、笠井優、坪井裕見、伊東剛、村上善則
2. 発表標題 免疫グロブリンスーパーファミリー分子群のタンパク質ライブラリーを用いた新規免疫チェックポイント分子の網羅的探索
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船城桐子、村上善則、伊東剛
2. 発表標題 小細胞肺がんの悪性化における細胞接着因子CADM1の機能解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Ito, Yuki Kumagai, Keiko Itano, Tomoko Maruyama, Kenji Tamura, Shuji Kawasaki, Takashi Suzuki, Yoshinori Murakami
2. 発表標題 Mathematical analysis of gefitinib resistance of lung adenocarcinoma caused by MET amplification
3. 学会等名 Meeting of JSPS Core-to-Core Program: Fusion of Mathematics and Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東剛
2. 発表標題 肺腺がんのMET増幅依存的ゲフィチニブ耐性の数理モデルを用いた解析
3. 学会等名 大阪大学数理・データ科学教育研究センター主催講演会：医学研究における数理的方法 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野 https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/hitogan/</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------