

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21539

研究課題名(和文)細胞接着分子群の結合の網羅的解析による新規がん病態解析法の構築と鍵分子の機能解析

研究課題名(英文)Development of novel intervening approaches to cancer progression by comprehensive analyses of interactions between cell adhesion molecules

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):細胞相互作用に関わり、脊椎動物で多様なファミリー分子群を形成する免疫グロブリン・スーパーファミリー(IgSF)分子群に注目し、細胞接着、細胞間、細胞・基質間相互作用に関わる分子間結合の新規鍵分子を同定することにより、接着を介する未知の生命現象を理解するとともに、接着異常が引き起こすがんの浸潤・転移、腫瘍免疫などの病態を解明し、病態修飾を目指し、以下の成果を得た。1)物理化学的手法により、IgSF 300分子以上の分子間結合検索を行った。2)がん転移、腫瘍免疫関わるIgSF分子を同定した。3)同定されたIgSF分子群の機能を、細胞、モデル動物を用いて検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgSF分子間結合は様々な細胞間接着に関わり、その異常はがんの浸潤・転移、腫瘍免疫(免疫チェックポイント)などに関わることが知られている。しかし、IgSF分子間結合は現時点ではゲノム、アミノ酸配列からは予測できず、個々の分子による実験的検証が唯一の解析手法である。本研究では、分子クローニング、ALPHA、SPR等の物理化学的手法による検索法を確立した。さらにがんの浸潤、転移の鍵分子を同定し、また免疫チェックポイントの新規鍵分子対を同定した。これらは、がんの新規治療の開発にも応用される重要で社会的意義も兼ね備えた研究成果である。

研究成果の概要(英文):Immunoglobulin superfamily molecules (IgSFs), one of the largest family proteins in vertebrates, are involved in a variety of cell-cell and cell-substrate interaction. To identify novel bindings of these IgSFs will provide a fundamental knowledge of biological phenomena triggered by cell-cell interaction. The information also leads to novel understanding of various diseases caused by abnormal cell-cell interaction, including tumor invasion/metastasis and tumor immunity. In this study, we obtained following results and outcomes.

1.Comprehensive screening of IgSF interaction of more than 300 molecules was performed by physico-chemical analysis. 2.Key molecules involved in invasion of T-cell lymphomas and in novel immune checkpoints were identified. 3.Functional assays of these key molecules in cell biological approaches or in animal model analysis were performed to obtain promising results to support that these molecules are possible molecular targets for cancer treatment.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質 がんの浸潤、転移 免疫チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

細胞接着を介する個体の制御は、多細胞生物の生命現象の根幹をなす機構の一つである。生体に生じるがんの浸潤・転移、炎症・免疫、感染等は、当該組織の微小環境によって複雑に制御され、この破綻が疾患を発生させる。この複雑性の多くは炎症細胞と上皮細胞、がん細胞と血管内皮細胞、ウイルスと上皮細胞等、系統の異なる細胞間や細胞・基質の相互作用・接着の複雑性、さらには当該細胞接着分子間結合の複雑性として分子レベルに落とし込むことができる。免疫グロブリン・スーパーファミリー (IgSF) 分子群は、数ある接着分子群の中でも分子種の多様性に富み、接着を介した細胞の時空間制御に関わることが解明されつつある。一方で IgSF 分子群の多くは IgSF 分子群同志、或いはインテグリン分子群のみの中で結合し、さらに個々の結合分子は数個以内に限定されることが多いので、生命現象の時空間的制御に適すると考えられる。そこで、申請者らはヒトで発現する細胞膜局在 IgSF 270 分子をクローニングし、細胞外ドメインの物理化学的手法による分子間相互作用、生物工学的的手法による分子・細胞間相互作用を検出可能な実験系を構築した。そこで、研究開始時に最も先端的課題であった項目を検討することにした。

2. 研究の目的

細胞接着、細胞間、細胞・基質間相互作用に関わる分子間結合の新規鍵分子の同定は、接着を介する未知の生命現象の理解にもつながり、また阻害抗体等を介する病態修飾も可能と期待される。そこで、本研究では IgSF 分子間、IgSF-インテグリン分子間結合等の検索を元に、新たな生命現象を探る挑戦的、かつ社会的意義の高い研究を目指す。

- 1) IgSF 389 分子、インテグリン 24 分子の分子間結合検索系の構築
- 2) がん転移、腫瘍免疫、ウイルス感染に関わる細胞間接着鍵分子の同定
- 3) 同定された IgSF 分子群の機能解析と、対応する接着分子病の実態解明

3. 研究の方法

1) IgSF 389 分子、インテグリン 24 分子の分子間結合検索系の構築

結合相手が未知だが機能的に重要な IgSF 分子に対し、IgSF389 分子、インテグリン 24 分子をクローニング(270IgSF は済)して、Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay (ALPHA)、Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi) 法に用いて特異的結合分子の同定を試みた。

2) 腫瘍免疫、がん転移、ウイルス感染に関わる細胞間接着鍵分子の同定

免役チェックポイントの結合分子未知の受容体、リガンドの分子-分子間結合は ALPHA、SPRi 法、がん転移の分子-がん細胞間結合は SPRi 法、ウイルス感染の分子-ウイルス間結合は SPRi 法で検索し、結合分子候補を同定した。

3) 同定された IgSF 分子群の機能解析と対応する接着分子病の実態解明

候補結合分子の機能を、固相化分子と重層細胞の検出系や個別の系で検証した。転移は当該遺伝子欠損マウスへのがん転移実験等で評価した。多機能を示す IgSF については

ノムの一塩基多型タイピング情報を元に、機能低下アレルのホモ接合体をデータ上同定し、検証した。

4. 研究成果

1) IgSF 389 分子、インテグリン 24 分子の分子間結合検索系の構築

結合相手が未知だが、免疫チェックポイントに関わる重要なオルファン受容体である IgSF の 2 分子に対し、結合するリガンド候補として、IgSF389 分子、インテグリン 24 分子の ALPHA 法による検索を進め、未報告のリガンド 2 分子を同定した。

2) 腫瘍免疫、がん転移、ウイルス感染に関わる細胞間接着鍵分子の同定

上記の方法により、細胞接着分子 CADM1 の結合分子 7 種を同定し、SPRi 法にて結合動態を検証した。また、免疫チェックポイントに関わる新たな IgSF 分子間結合として、1) で同定した 2 対の分子間結合については、各々、発現する腫瘍細胞、免疫細胞の種類を同定し、また分子構造から免疫抑制作用を有することを見出し、候補分子として詳細な作用機構の研究へと進んだ。

3) 同定された IgSF 分子群の機能解析と対応する接着分子病の実態解明

ATL細胞で特異的に発現するCADM1に注目した解析では、腫瘍細胞のCADM1と、宿主モデルマウスの肝臓における血管内皮細胞に発現するADM1とのトランス・ホモ結合が、悪性T細胞リンパ腫の肝臓への浸潤を促進すること、このいずれのCADM1発現を欠如させても、肝臓浸潤が低下することを示し、単一 IgSF 細胞接着分子群の結合が、腫瘍の臓器浸潤、転移形成を導くことを示した(文献1)。免疫チェックポイントの鍵分子の検索では、腫瘍細胞と免疫細胞の混合培養の際に、これらの鍵分子の有無によって、腫瘍細胞の視細胞の数の増減、サイトカイン分泌の量の増減を検出し、同定したIgSF分子対が、モデル系で免疫チェックポイント分子として機能することを確認した(特許、論文準備中)。

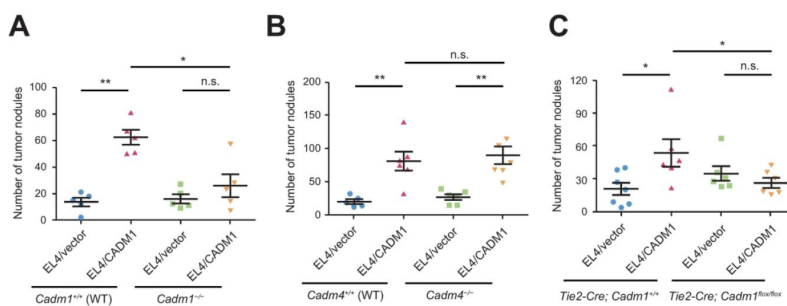


図1. マウスT細胞リンパ腫細胞 EL4 に CADM1 を発現させると、尾静脈-肝転移が増加するが、*Cadm1* 遺伝子欠損マウスではこの増加は認められない(A)。一方 CADM1 との結合が示された *Cadm4* 遺伝子欠損マウスでは、EL4 + CADM1 による尾静脈-肝転移の増加は低下しない(B)。さらに、EL4 + CADM1 による尾静脈-肝転移の増加は、*Cadm1* を Tie2 Cre の下流に挿入し、血管内皮細胞特異的に遺伝子欠損を生じさせたマウスにおいて認められなかった。以上から、T細胞リンパ腫細胞と血管内皮細胞の両者に発現する CADM1 のトランス・ホモ結合が、尾静脈-肝転移の成立に必須であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Funaki T, Ito T, Tanei Z, Goto A, Niki T, Matsubara D, Murakami Y. | 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 Biochem Biophys Res Commun | 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 - |
| 1. 著者名 Murakami F, Tsuboi Y, Takahashi Y, Horimoto Y, Mogushi K, Ito T, Emi M, Matsubara D, Shibata T, Saito M, Murakami Y. | 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 Sci | 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 Tsuboi Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Ito A, Matsubara D, Murakami Y. | 4. 巻 529 |
| 2. 論文標題 CADM1 suppresses c-Src activation by binding with Cbp on membrane lipid rafts and intervenes colon carcinogenesis. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun | 6. 最初と最後の頁 854-860 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.103 | 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 Kasai Y, Gan SP, Funaki T, Ohashi-Kumagai Y, Tominaga M, Shiu S-J, Suzuki D, Matsubara D, Sakamoto T, Sakurai-Yageta M, Ito T, Murakami Y. | 4. 巻 113 |
| 2. 論文標題 Trans-homophilic interaction of CADM1 promotes organ infiltration of T-cell lymphoma by adhesion to vascular endothelium. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Sci | 6. 最初と最後の頁 1669-1678 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15307 | 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4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Murakami Y |
| 2. 発表標題 Cohorts and biobanks, essential resources for cancer research and medicine. |
| 3. 学会等名 Khon Kaen University and IMSUT International Mini-Symposium supported by the International Joint Usage-Joint Research Program (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshinori Murakami, Koichi Matsuda, Takayuki Morisaki, Yukihide Momozawa, Toshiki Watanabe, Yataro Daigo, Kenji Wakai. |
| 2. 発表標題 Cohorts and biobanks as essential resources for accelerating precision medicine in cancer. |
| 3. 学会等名 The 79th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Core Symposium. (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tsuchiya T, Kuwano H, Ito T, Nagata M, Kawai T, Matsubara D, Okamoto I, Tamura K, Nakajima J, Oba M, Murakami Y. |
| 2. 発表標題 Novel mechanisms of EGFR-TKI resistance and clonal evolution of lung adenocarcinoma by over expression of a cell adhesion molecule, CADM1. |
| 3. 学会等名 AACR Special Conference, Tumor Heterogeneity (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ito T, Funaki T, Iwanari H, Tanaka G, Nagase T, Hamakubo T, Murakami Y. |
| 2. 発表標題 Development of a novel serum marker for detecting small cell lung cancer by targeting a Cell Adhesion Molecule 1 (CADM1). |
| 3. 学会等名 2020 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

人癌病遺伝子分野におけるがん研究
<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/hitogan/index.html>

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 |
|-------------------|---|---------------------------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 伊東 剛 (Ito Takeshi) (20733075) | 東京大学・医科学研究所・助教 (12601) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|