

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25年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300336

研究課題名（和文）細胞接着分子群の解析に基づく、がんの個性診断法の開発

研究課題名（英文）Physiological and pathological analyses of cell adhesion molecules towards the development of diagnostic markers of human cancer

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

研究成果の概要（和文）：細胞接着分子群の解析に基づくがんの個性診断法の開発を目指した研究を行い、細胞接着分子 CADM1 のスプライシング・バリエントが小細胞肺がんにて特異的に発現し、診断マーカー候補となること、また、CADM1 が MET シグナル経路を抑制し、肺腺がん細胞のゲフィニブ耐性獲得に関わり、耐性予測マーカーとなる可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Physiological and pathological roles of cell adhesion molecules in cancer development and progression were analyzed to establish novel molecular markers of human cancer. We found that a splicing variant of a cell adhesion molecule CADM1 was expressed exclusively in small cell lung cancer (SCLC), providing a candidate diagnostic marker of SCLC. We also found that CADM1 could cross-talk with the MET signaling and may play a role in acquired resistance of lung adenocarcinoma against EGFR-TKI treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：がんの個性診断

1. 研究開始当初の背景

進行がんに対する化学療法、分子標的療法の進歩により、個々のがんの治療応答性などを予測し、最適な治療法を選択するためのがんの個性診断法の開発、確立が望まれる。本研究は、細胞接着分子の網羅的、集中的解析に基づく新しいがんの個性診断法の開発を目指すものである。がんにおける細胞接着分子の研究は従来カドヘリン、インテグリンが中心であった。一方、免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子 (IgCAM) は 50 種以上存在するが、癌での知見は腫瘍マーカー CEA 等、限られてきた。申請者らは非小細胞肺癌 (NSCLC) 抑制遺伝子として IgCAM に属する CADM1/TSLC1 を同定し (1)、CADM1 が多くの進行がんで不活化すること (2,3,4,5)、下流分子経路もがん化に重要であること (6,7)、細胞接着に関わり上皮間葉転換を抑え、上皮様形態形成に関わること (8,9,10)、遺伝子ホモ欠損マウスが雄性不妊を示すこと (11) 等を報告してきた。また、ATL では CADM1 が異所性に発現し、有望な発症前診断マーカーであることを共同研究で示した (12)。このように申請者らは 2001 年の遺伝子同定以来、上皮、精子形成、免疫応答、神経接着などでも多彩な機能を示す CADM1 の研究を世界的にリードし、成果の一部は臨床応用の前段階 (於 ATL) にある。

さらに最近、

① CADM1 が肺細胞で MET と複合体を形成し、HGF による MET と下流の活性化を抑制し、MET の過剰発現による EGFR チロシン・キナーゼ阻害剤 (TKI) 治療の耐性獲得を修飾すること

② 小細胞肺癌 (SCLC) では CADM1 が

高発現し、悪性形質を促進すること

③ 上皮、ATL、SCLC で各々特異的糖鎖修飾、スプライスバリエントがみられること等の、非常に興味深い知見を得ている。特に①に関しては、Ig 分子群が増殖因子受容体と細胞接着分子に二分され、各々の Ig ループを介した多様なクロストークが予測されることから、大きな命題である。

2. 研究の目的

細胞接着分子は、がんの浸潤、転移の多段階の各局面で、単に接着のみならず細胞死の誘導や増殖制御等多様な役割を果たす。特に、増殖因子受容体経路とのクロストークによる増殖制御機構がごく最近明らかになり、がんの分子標的治療薬の効果を修飾し、がんの個性に深く関わる事が明らかになりつつある。また、糖鎖修飾、スプライシング多様性など従来の DNA、RNA、蛋白質の網羅的解析では検出できない特徴を示す。申請者らは、がん抑制遺伝子として同定した免疫グロブリン様細胞接着分子 (IgCAM)、CADM1/TSLC1 の解析経験と新規知見に基づき、下記を研究の目的とする。

- ① IgCAM と増殖因子受容体経路とのクロストークに基づく分子標的療法の効果診断法の開発
- ② 乳がん、膀胱がんにおける細胞接着分子 CADM1 の分子経路の解析と CADM1 遺伝子発現制御機構の解析
- ③ CADM1 を標的とした ATL、SCLC の診断、治療法の開発、並びに遺伝性腫瘍の検索

3. 研究の方法

① CADM1 と MET 経路のクロストークの解析：CADM1 と MET の複合体形成の有

無は免疫沈降・ウェスタンブロット法、GST プルダウン法により検討した。ゲフィティニブ耐性肺腺がん細胞、親細胞などは、他との共同研究により入手した。CADM1, CADM4 の機能はプラスミドによる発現導入により検討した。

②乳がん、膀胱がんにおける細胞接着分子 CADM1 の分子経路の解析と CADM1 遺伝子発現制御機構の解析：乳がん、膀胱がん組織は順天堂大学乳腺外科、東京大学医学部泌尿器科との共同研究により入手した。CADM1, CADM4, 4.1B, 4.1N 等のタンパク質の発現は特異抗体を用いた免疫組織染色、ウェスタン・ブロット法にて、mRNA の発現はノーザンブロット法、RT-PCR 法にて、また遺伝子プロモーター領域のメチル化の有無は、重亜硫酸処理・塩基配列決定によって検討した。

③CADM1 を標的とした ATL, SCLC の診断、治療法の開発、並びに遺伝性腫瘍の検索：
CADM1 スプライシング・バリエントの解析は、RT-PCR 法、RT-PCR-SSCP 法等を用いて行った。細胞の悪性形質の評価は、in vitro 凝集能、ヌードマウスでの腫瘍形成能などにより検討した。

4. 研究成果

細胞接着分子群の解析に基づくがんの個性診断法の開発を目指した研究を行い、以下の結果を得た。

①肺がん、大腸がんにおける CADM1 と増殖因子受容体とのクロストーク：非小細胞肺がん細胞では CADM1 と MET が共沈し、HGF による HGF-MET シグナルの活性化を CADM1 が抑制することを実験的に示し

た。さらに、非小細胞肺がん組織で CADM1 の発現と MET のリン酸化とが相反する傾向にあることを見出した。そこで、培養細胞を用いて、ゲフィティニブによる耐性獲得機構に CADM1 が関わる可能性を検討し、MET 増幅による耐性獲得に CADM1 の発現欠如が関連する可能性を示した。

② 膀胱がん、乳がんにおける細胞接着分子 CADM1 の異常と、その意義の解析：手術摘出膀胱がん 147 例、乳がん 67 例の免疫組織染色の解析から、それぞれ約 63%、70%で CADM1 の発現欠如、タンパク質の膜局在の異常を認めた。これらの異常は臨床病期の進行に伴って認められ、膀胱がんでは独立した予後予測因子となることを示した。また、大腸がんでは、CADM1 が細胞膜の脂質ラフト内で Csk-binding protein (CBP)、SRC と複合体を形成し、SRC による活性化を抑制する可能性を見出した。また、CADM1 遺伝子の転写がレンチノイン酸によって活性化される分子機構に、転写因子 Sp1 が関与していることを示した。

③ CADM1 を標的とする ATL、小細胞肺がん(SCLC) の診断、治療法の開発の基礎研究：CADM1 が SCLC ではバリエント 8/9 というスプライス・バリエントを特異的に発現することを示した(図1)。さらに、培養上清には CADM1 細胞外断片が検出されることを示した。そこで、SCLC の特異的診断を目指して抗体を用いたサンドイッチ法による血清での CADM1 検出法の悪率を目指している。また、上皮細胞で発現する CADM1 バリエントが6か所の N 型糖鎖修飾をうけ、また O-型糖鎖にはシアル酸が修飾することを共同研究により示した。

2012.
(DOI:10.1016/j.bbrc.2011.11.140.)
9. Takahashi Y, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Murakami Y et al. (11 人中第 5、6、7、最終著者) Aberrant expression of tumor suppressors, CADM1 and 4.1B, in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*, 19:242-252, 2012. (DOI: 10.1007/s12282-011-0272-7.)
 10. Nagata M, Sakurai-Yageta M, Murakami Y et al. (11 人中第 2、最終著者) Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*, 130:1329-1337, 2012. (DOI: 10.1002/ijc.26160)
 11. Watanabe K, Goto A, Takai D. (14 人中第 9 著者) Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 130:2580-2590, 2012 (Doi: 10.1002/ijc.26254.)
 12. Abe J, Goto A, Matsushima K et al. (10 人中第 6 著者) B cells regulate antibody responses through the medullary remodeling of inflamed lymph nodes. *Int Immunol*. 24:17-27, 2012. (DOI: 10.1093/intimm/dxr089)
 13. Ito T, Sakurai-Yageta M, Murakami Y et al. (8 人中第 7、最終著者) Transcriptional regulation of the *CADM1* gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells. *Genes to Cells*, 16:791-802, 2011. (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01525)
 14. Mimae T, Murakami Y, Tsuda H. (10 人中第 6 著者) Steroid Receptor Expression in Thymomas and Thymic Carcinomas. *Cancer*, 117:4396-4405, 2011. (DOI: 10.1002/cncr.26061)
 15. Hagiya M, Murakami Y and Ito A. (9 人中第 8、最終著者) Enhanced Nerve-Mast Cell Interaction by a Neuronal Short Isoform of Cell Adhesion Molecule-1, CADM1. *J Immunology*, 186:5983-5992, 2011. (DOI: 10.4049/jimmunol.1002244.)
 16. Hosokawa Y, Murakami Y, Ito A. (5 人中第 4、最終著者) Non-contact estimation of intercellular breaking force using a femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1777-1872, 2011. (DOI:10.1073/pnas.1006847108.)
 17. Kitano K, Goto A, Takai D et al. (14 人中第 10 著者) CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 102:2126-31, 2011. (DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02101.)
 18. Goto A, Fukayama M et al. (17 人中第 1 著者) Human papillomavirus infection in lung and esophageal cancers: analysis of 485 Asian cases. *J Med Virol*. 83:1383-1390, 2011. (DOI: 10.1002/jmv.22150.)
 19. Morita S, Goto A, Fukayama M et al.

- (8人中第2著者) Multicystic mesothelioma of the pericardium. *Pathol Int.* 61:319-21, 2011. (DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02654.)
20. Miyazaki H, Goto A, Fukayama M et al. (8人中第2著者) Pleural cavity angiosarcoma arising in chronic expanding hematoma after pneumonectomy. *Hum Pathol.* 42:1576-1579, 2011. (DOI: 10.1016/j.humpath.2010.06.019.)
21. Masuda M, Murakami Y et al. (13人中最終著者) CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) transformed cells and adult T-cell leukemia (ATL) cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285:15511-15522, 2010. (doi: 10.1074/jbc.M109.076653.)

[学会発表] (計62件)

1. Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 3rd Joint Symposium of the Max-Planck Society and University of Tokyo Graduate School of Medicine. 2013年3月8日、東京、日本。

[図書] (計2件)

1. 村上善則 細胞周期、細胞接着に関わるがん抑制遺伝子、pp113-121、渋谷正史、湯浅保仁編、がん生物学イラストレイテッド、羊土社、2011年7月10日 など

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計2件)

1. 村上善則、増田万里・国立大学法人東京大学・がんの診断、処置およびまたは予防、およびまたは浸潤・転移の抑制のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法・特許第5131946号 (2012/11/16登録)・日本。
2. 村上善則・国立大学法人東京大学・小細胞肺癌がんの診断のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法・特許第5131751号 (2012/11/16登録)・日本。

[その他]

ホームページ <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

- ・伊藤 彰彦 (ITO AKIHIKO)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：80273647
- ・桜井 美佳 (SAKURAI MIKA)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：80508359
- ・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
- ・松原 大祐 (MATSUBARA DAISUKE)
東京大学・医科学研究所・講師
研究者番号：80415554

(3)連携研究者：なし