

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790310

研究課題名(和文) 生体イメージングを用いた細胞接着分子CADM1のがん化における役割の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of a cell adhesion molecule, CADM1, in tumor progression

研究代表者

櫻井 美佳 (SAKURAI, MIKA)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師

研究者番号：80508359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Cadm1欠損マウス肺腫瘍由来の高浸潤性IMSMP-1細胞に恒常的にGFPを発現させ、ヌードマウスの脾臓から肝臓に浸潤させ、癌細胞を血管とともに多光子レーザー顕微鏡で観察する生体蛍光観察系を確立した。また、成人T細胞白血病(ATL)関連細胞株(MT-2)を免疫不全NOGマウスの尾静脈に投与し、ヒトATLの特徴である多臓器浸潤を示すマウスモデルを構築した。1日後に肝臓に浸潤した細胞を観察すると、shCADM1/GFP発現細胞では血管内からextravasationする細胞の割合が減少し、CADM1がATLの浸潤初期における血管への接着、extravasationの過程に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：IMSMP-1 cells derived from lung tumor spontaneously developed in cadm1-deficient mice were constitutively expressed with GFP, and injected into spleen of nude mice. In the following day, tumor cells invaded into liver can be seen by intravital imaging using multi-photon laser microscope. Then, we injected adult T-cell leukemia (ATL)-related MT-2 cells into the tail vein of NOG mice and established the mouse model of human ATL with multi-organ infiltration. MT-2 cells were then constitutively transfected with expression vectors of shCADM1 and GFP. One day after injection, the extravasation of MT-2 cells into liver were reduced in shCADM1-expressing cells compared with shControl-expressing cells, indicating that the expression of CADM1 is important for the early stage of ATL cell invasion.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：がん CADM1 ATL 細胞浸潤 多光子励起顕微鏡 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

CADMI(*Cell adhesion molecule 1*)/*TSLC1*(*Tumor suppressor in lung cancer 1*)は、マウス生体における移植したヒト肺がんの増殖抑制を指標として同定されたがん抑制遺伝子である。*CADMI*は染色体11q23.1における代表的ながん抑制遺伝子として機能し、その発現は肺がんを始め、乳がん、膵がんなど上皮由来のがんの30-60%において、その進展の後期、つまり多段階発がんモデルの浸潤・転移の過程で減少または欠如する。正常の上皮細胞に発現する*CADMI*蛋白質は、細胞接着面に局在し細胞間接着を司る。*CADMI*はその細胞内領域で、アクチン細胞骨格に連結する裏打ち蛋白質である protein 4.1 群、およびアダプター蛋白質である *MAGuK*(*Membrane associated guanylate kinase*)群と三量体を形成して、上皮構造の形成・維持に関与すると考えられている。申請者は、siRNAによる*CADMI*の発現抑制が上皮構造の破綻を示すことから、*CADMI*が上皮細胞の構造維持に重要であることを示している。さらに、静的に見える接着維持の状態でも*CADMI*, protein 4.1 *MAGuK*の約半数の分子は数分の間に入れ替わり、*CADMI*経路の分子群が動的に制御されていることを示した。また、*Cadm1*欠損マウスにおいて肺がんの自然発生が見られたことから、*CADMI*が生体内においても上皮のがん抑制に働くことが示されている。

一方、血球系の細胞は通常*CADMI*を発現しないが、12,000遺伝子を用いたマイクロアレイ解析により、ATLにおいて発現が上昇する第1位の遺伝子として*CADMI*が同定された。さらに我々の研究室において、ATL細胞に発現する*CADMI*がRhoファミリー低分子量G蛋白質に対するグアニンヌクレオチド交換因子である *Tiam1* (*T-lymphoma invasion and metastasis 1*)を介してRacを活性化することが示された。ATLにおける

*CADMI*は血管内皮細胞との接着面局在し、Racを活性化させることで細胞運動を促進し、浸潤・転移に機能すると考えられる。

このように上皮およびATL細胞を用いた研究により、*CADMI*のがん抑制と浸潤促進の二つの異なる機能は、その細胞内領域に結合する分子の違い、また局在や動態制御の違いにより発揮されることが示唆された。しかしながら、生体内における*CADMI*およびその下流分子群の動態や機能が、がんの増殖や浸潤・転移にどのように関与するのかについては未解明の点が多く残されている。

2. 研究の目的

(1) 上皮細胞由来のがんにおける *CADMI* と下流分子群の生体内での動態と役割の解明

*CADMI*の生体内での機能を調べるために我々の研究室で*Cadm1*欠損マウスを作製したところ、発生初期に異常は認められないものの、その約3割において生後15ヵ月以降に肺がんの自然発生が認められた。この欠損マウスに形成された肺腫瘍は、病理学的解析から肺胞上皮に由来する腺腫および腺がんであることが示されたことから、*CADMI*は生体内においても肺胞上皮細胞のがん抑制蛋白質として働くことが示唆された。

さらに我々は*Cadm1*欠損マウス由来の肺腫瘍よりIMSMP-1細胞を樹立した。興味深いことに、IMSMP-1細胞は、正常免疫を持つマウスの皮下に移植しても腫瘍の形成を認めることから、この細胞を用いてより生理的な条件下で生体内におけるがん化の進展を追跡することが可能である。またIMSMP-1細胞をヌードマウスの皮下に移植した場合には、腫瘍形成に加えて、肺、肝臓およびリンパ節への転移が見られ、さらに腹腔に注入すると腫瘍細胞を含む腹水を生じ、2週間で死に至ることが明らかになった。そこで本研究では、IMSMP-1細胞に蛍光蛋白質を発現さ

せ、様々な腫瘍形成・転移系を用いて、腫瘍の増殖および浸潤・転移の過程を生体蛍光観察(intravital imaging)により時空間的に解析する。

(2) ATL 細胞の浸潤における CADM1 と下流分子群の生体内での動態と役割の解明

ATL に異所性に発現する CADM1 は、上皮細胞では MAGuK 群と結合する PDZ 結合領域を介して Tiam1 と結合し Rac を活性化させることで、ATL の血管内皮細胞へ接着を促進する。このとき CADM1 は ATL 細胞に形成される浸潤突起様の構造部分に局在し、ATL が内皮間隙あるいは内皮細胞内を通過する内皮下浸潤(Trans-endothelial migration, TEM)を促し、浸潤・転移に関与すると考えられている。このように ATL と血管内皮細胞を用いた培養細胞系における研究は進行している一方で、マウス生体において、ヒト由来の ATL の浸潤を調べることは困難であり、ごく僅かな系の報告しかない。そこでまず、様々な ATL 細胞を各種免疫不全マウス(NOD/SCID, NOG)の血管に注入し、多臓器への浸潤を示す ATL の浸潤モデル系を構築する。

次に、ATL の生体内の浸潤における CADM1, Tiam1 の役割を調べる目的で、CADM1 あるいは Tiam1 に対する shRNA を発現させた ATL 細胞を用いて同様の観察を行う。さらに、CADM1 による生体内の浸潤促進効果が明らかになれば、生体蛍光観察法や生体外(ex vivo)における組織の観察を行うことにより、そのメカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) 上皮細胞由来のがんにおける CADM1 と下流分子群の生体内での動態と役割の解明

Cadm1 欠損マウス肺腫瘍より我々の研究室で独自に樹立された IMSMP-1 細胞は、上皮様の形態を示し、接触阻害による増殖抑制を示さない細胞である。この IMSMP-1 細胞

の生体内での観察を可能にするため、まず蛍光蛋白質(GFP)を恒常的に発現させたクローンを樹立する。次にこれらの蛍光蛋白質を発現する IMSMP-1 細胞を、正常免疫を有する C57BL6/J マウスの皮下に注入し、がんの増殖や転移を観察する。これまでの研究により、IMSMP-1 細胞を皮下に注入し、約 20 日で皮下腫瘍が形成されることから、この時期に腫瘍形成部分の皮膚にカバーガラスを縫合し、倒立顕微鏡ステージ上に設置した飼育箱の中で麻酔を行いながら、多光子レーザーを用いた腫瘍の観察を行う。これにより生理的な条件下で、腫瘍内の血管新生、またがん細胞の毛細血管内への浸潤を解析する。このとき TexasRed 標識したデキストランを検鏡の直前に尾静脈より投与し、血管を同時に可視化することで、腫瘍の血管内侵入を解析する。

(2) ATL 細胞の浸潤における CADM1 と下流分子群の生体内での動態と役割の解明

ATL 細胞株はヒト由来のためマウスへの移植実験は困難であるが、いくつかの ATL 細胞株は免疫不全マウスの腹腔に移植すると、ATL 細胞が腹腔内で増殖し、また数ヵ月後には脾臓、肺組織などへ生着するという報告がある。そこでまず我々の研究室で保有する ATL 細胞株に蛍光蛋白質を発現させ、免疫不全の NOD/SCID あるいは NOG マウスへ投与し、ATL の浸潤性を解剖により評価し、ヒトの ATL の特徴である皮膚や多臓器への浸潤と腫瘍形成を示すマウスモデルを構築し、同時にその生体蛍光観察を試みる。培養細胞系による ATL の内皮下浸潤(TEM)においては、CADM1 はその浸潤の先端部の突起様の構造に局在し、TEM を促進すると考えられている。そこで ATL 細胞に発現する CADM1 の生体内での浸潤における役割を調べるために、CADM1 の発現を shRNA により抑制した ATL 細胞を用いてマウス浸潤モデル系による解析を試みる。CADM1 の恒常的な抑制により

培養 ATL の増殖に影響が出た場合には、テトラサイクリン誘導型などの発現ベクターを用いて shCADM1 を発現させる。さらに ATL 細胞がどの組織に生着するのか調べるために、ATL 細胞を尾静脈より投与し、一定期間を経た後に、組織を切除し生体外において蛍光観察を行う。

4. 研究成果

(1) 上皮細胞由来のがんにおける CADM1 と下流分子群の生体内での動態と役割の解明

まず、多光子レーザー顕微鏡を用いた生体蛍光観察(Intravital imaging)系の構築を試みた。倒立および正立顕微鏡に多光子レーザーを搭載したシステムを使用し、GFP 発現トランスジェニックマウスを麻酔下にて開腹し、肝臓、脾臓、小腸など様々な臓器の観察を行った。臓器により、倒立あるいは正立顕微鏡による観察に適していることが分かった。さらに TexaRed デキストランを尾静脈より導入し同時に血管の可視化を行った。次に、*Cadm1* 欠損マウスの肺腫瘍より樹立された高浸潤性の IMSMP-1 細胞に GFP を発現させたクローンをヌードマウスの皮下に移植し、数週間維持し腫瘍を形成させた。解剖により、この皮下腫瘍の周辺には多くの血管が観察され、腫瘍の血管への浸潤が予測された。さらに、TexasRed デキストラン導入による血管の可視化により腫瘍周辺の血管新生の亢進が観察されたが、血管内に浸潤する細胞を観察することは困難であった。

さらに、この IMSMP-1 細胞をヌードマウスの脾臓に投与し、1 日後に肝臓に転移した細胞を観察すると、TexasRed デキストランの尾静脈投与による血管の可視化と組み合わせることにより、血管内に留まる細胞および組織内に漏出した(extravasation)細胞が検出された。IMSMP-1 細胞の高浸潤性という特徴を生かし、浸潤過程のタイムラプス観察の

系を構築することが可能となった。

(2) ATL 細胞の浸潤における CADM1 と下流分子群の生体内での動態と役割の解明

ATL 細胞株はヒト由来であり、マウスへの移植実験は困難であることから、これまで数例の報告しか存在しない。そこで我々の研究室で保有する ATL 細胞株を免疫不全の NOD/SCID あるいは NOG マウスへ投与し、ヒトの ATL の特徴である皮膚や多臓器への浸潤と腫瘍形成を示すマウスモデルの構築を試みた。ATL の浸潤性を免疫組織染色により評価したところ、MT-2 細胞を NOG マウスの尾静脈へ移植した場合において、肺、肝臓、脾臓、骨への浸潤が観察された。特に肝臓への浸潤・転移は著しく、肉眼による観察で容易に腫瘍結節が認められた。

次に、CADM1 に対する shRNA 発現ベクターを構築し GFP 発現ベクターとともに MT-2 細胞に導入し、MT-2/shCADM1/GFP 発現クローンを得た。この細胞株は、shControl 導入細胞株と比較して、*in vitro* における増殖能には変化がないが、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)への接着能が有意に低下していた。これらの細胞株を NOG マウスに投与し約 25 日後に多臓器への細胞浸潤を評価したところ、shCADM1 導入細胞株では肝臓における腫瘍結節数の低下が観察された。さらに肝臓への浸潤機構のより詳細な解析を試みたところ、shCADM1 導入 MT-2 細胞が浸潤した肝臓における血管数は shCADM1 導入細胞を投与した場合と変化がなく、血管新生能には影響がないことが分かった。一方、shCADM1 導入細胞の投与により、肝臓内に浸潤した腫瘍内部のネクローシスは有意に減少し、さらに血管内で増殖した腫瘍塊による血栓形成の減少が見られた。

さらに、ATL における CADM1 の発現が、肝臓の血管との接着および extravasation に関与するかどうかを調べるため、

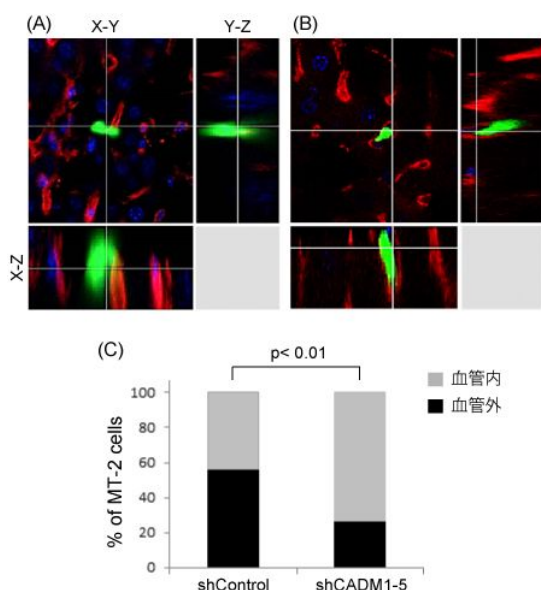


図1. 肝臓に浸潤した MT-2/GFP 細胞(緑)の共焦点顕微鏡によるイメージング。抗 CD-31 抗体により可視化した血管(赤)および核(青) また水平面(X-Y)および垂直面(X-Z, Y-Z)の像を示している。血管外に漏出した細胞(A)、血管内に留まる細胞(B)の代表例。(C) 血管内および血管外に存在する、shControl または shCADM1 発現 MT-2/GFP 細胞の細胞の比率。

MT-2/shControl/GFP 細胞、MT-2/shCADM1/GFP 細胞を尾静脈に投与後 1 日後に肝臓のイメージングを行った。NOG マウスを用いた生体イメージングは不可能であったが、切除した肝臓を抗 CD31 抗体により染色し、共焦点顕微鏡による 3D イメージングを行った(図 1A, 1B)。その結果、shCADM1 発現細胞では shControl 発現細胞と比較して、血管内より extravasation する細胞の割合が減少していた(図 1C)。この結果から、ATL における CADM1 の発現が、浸潤初期における血管への接着から extravasation の過程に重要であることが示された。

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)

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*, 査読有、10(3): e0116637, 2015.

DOI: 10.1371/journal.pone.0116637

Ito T., Sakurai-Yageta, M., Goto A., Pairojkul C, Yongvanit P, Murakami Y. Genomic and transcriptional alterations of cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 査読有、21(6):380-7, 2014. DOI: 10.1002/jhbp.67.

Murakami, S., Sakurai-Yageta, M. (equal contribution), Maruyama, T., Murakami, Y. Trans-homophilic interaction of CADM1 activates PI3K by forming a complex with MAGuK-family proteins MPP3 and Dlg. *PloS One*, 査読有、9(2): e82894, 2014.

DOI:10.1371/journal.pone.0082894

Kikuchi, S., Iwai, M., Sakurai-Yageta, M., Tsuboi, Y., Ito, T., Maruyama, T., Tsuda, H., Kanai, Y., Onizuka, M., Sato, Y., Murakami, Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Sci*, 査読有、103: 1051-7, 2012. DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02277.x.

Ishimura, M., Sakurai-Yageta, M., Maruyama, T., Ando, T., Fukayama, M., Goto, A., Murakami, Y. Involvement of miR-214 and miR-375 in malignant features of Non-small-cell lung cancer by down-regulating CADM1. *J Cancer Therapy*, 査読有、3: 379-387, 2012

DOI: 10.4236/jct.2012.324050

[学会発表](計 7 件)

櫻井 美佳、川目 裕、鈴木 洋一、「東北メディカル・メガバンク機構におけるゲノム・メディカルリサーチコーディネーター教育の現状と課題」日本人類遺伝学会第 59 回大会 2014 年 11 月 21 日、

タワーホール船堀（東京）
許淑真、櫻井美佳、松原大祐、坪井裕見、
村上善則、「細胞接着分子 CADM1 による EGF 受容体の分解制御機構の解明」、
第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜（横浜）
伊東剛、永田政義、川合剛人、丸山智子、
櫻井（八下田）美佳、伊藤彰彦、後藤明輝、松原大祐、村上善則、「遺伝子欠損マウスを用いた CADM1 の肺腫瘍抑制における役割の解明」、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜（横浜）
小粥浩之、櫻井 八下田美佳、村上善則、「CADM1 は新しいタイプの dependence receptor として、がん細胞の転移を抑制する」、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜（横浜）
許淑真、桜井美佳、坪井裕見、村上善則、「細胞接着分子 CADM1 による EGF 受容体の分解制御機構の解明」、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜（横浜）
村上善則、桜井美佳、村上成文、伊東剛、小粥浩之、松原大祐、「正常上皮、がんの浸潤、転移における細胞接着分子 CADM1 の役割」、第 73 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜（横浜）
Mika Sakurai-Yageta., Tomoko Maruyama., Kaoru Kaneshiro., Sadanori Sekiya., Shinichi Iwamoto., Koichi Tanaka., Yoshinori Murakami. MALDI MS analysis of N-glycan structures of a cell adhesion molecule, CADM1, in various cancer cells. 61th American Society for Mass Spectrometry Conference. 2013 年 6 月 11 日, Minneapolis, USA

〔その他〕
ホームページ等

東北大学東北メディカル・メガバンク機構人材育成部門遺伝疫学研究支援分野ホームページ

<http://www.genepi.megabank.tohoku.ac.jp>

東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 美佳 (Sakurai, Mika)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師

研究者番号：80508359

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし