

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790802

研究課題名(和文)細胞接着分子CADM1を分子標的とする小細胞肺癌の治療法の開発

研究課題名(英文)CADM1 as a potential therapeutic target in small cell lung cancer

研究代表者

菊池 慎二(Kikuchi, Shinji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80588971

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)：小細胞肺癌(SCLC)における免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子CADM1の役割について研究した。まず、CADM1がSCLC細胞株では高頻度に過剰発現し、正常肺や正常脳では認めない特異的なスプライシングを受けていることを見出した。機能解析では、siRNAによりCADM1発現を抑制したSCLC細胞では球状細胞集塊の形成が抑制された。さらに、肺癌手術検体の免疫組織化学染色では、CADM1がSCLCの71%で強陽性であり、患者の予後不良と有意に相関することを見出した。CADM1バリエーションがSCLCの悪性増殖能に強く相関しており、治療の分子標的となる可能性を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigate the roles of CADM1, a member of the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules, in small cell lung cancer (SCLC). Western blotting and RT-PCR analyses have revealed that CADM1 is significantly expressed in 11 of 14 SCLC cells growing in suspension cultures but in neither of 2 SCLC cells showing attached growth to plastic dishes, suggesting that CADM1 is involved in anchorage-independent growth in SCLC. Then, we demonstrate that SCLC expresses a unique splicing variant of CADM1. This variant is almost exclusively observed in SCLC and testis. Interestingly, suppression of CADM1 expression by shRNA reduced spheroid-like cell aggregation of SCLC cells. Immunohistochemistry demonstrates that CADM1 is strongly expressed in 24 of 34 (71%) SCLC. Overexpression of CADM1 was significantly associated with poor prognosis in surgical patients. These findings suggest that CADM1 enhances the malignant features of SCLC, and could provide a molecular target specific to SCLC.

研究分野：肺癌

キーワード：小細胞肺癌 CADM1 スプライシングバリエーション 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌 (SCLC) は急速な進展能と高い転移能を有する難治性腫瘍の代表である。現在の治療は化学療法が中心であるが、3年生存率が限局型で約30%、進展型で約10%と困難を極めている。そのため、SCLCの分子機構を明らかにすること、特に浸潤、転移能と抗癌剤抵抗性を分子生物学的に解明することによる新たな治療法の開発が強く望まれている。

がんの浸潤、転移には様々な細胞接着分子が関与する。細胞接着分子は細胞膜上に発現するため、腫瘍特異的な発現は診断標的として重要である。また、細胞接着分子はヒト化抗体による機能阻害が医薬品開発に直接結びつく可能性がある。我々は、非小細胞肺癌 (NSCLC) の癌抑制遺伝子として免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子 (IgCAM) に属する CADM1/TSLE1 を同定した (Kuramochi *et al*, Nat. Genet. 27, 427-30, 2001)。CADM1 遺伝子産物は 442 アミノ酸からなる 1 回膜貫通型糖タンパク質で、細胞外領域は 3 個のイムノグロブリンループからなる。NSCLC 103 例中 45 例 (44%) が主にメチル化により不活化され、メチル化は重喫煙の男性患者の腫瘍で有意に多く、予後不良因子であることを報告した (Kikuchi *et al*, Cancer 106(8), 1751-8, 2006)。一方、CADM1 は成人 T 細胞性白血病 (ATL) で異所性に高発現し、異なる糖鎖修飾を受けて特異的診断マーカー候補となることが報告された (Sasaki *et al*, Blood, 105, 1204-13, 2005)。最近では、ATL において CADM1 が低分子量 G タンパク質 Rac の活性化因子である Tiam1 (T-lymphoma invasion and metastasis 1) と細胞内で恒常的に結合し、Rac を活性化することにより細胞運動能を増強させることを見出した (Masuda *et al*,

JBC, 14;285(20):15511-22, 2010)。

SCLC は上皮性腫瘍でありながら白血病のように単一細胞状態で極めて高い転移能を有するという特徴をもつ。我々は、ATL と同様に SCLC においても、CADM1 が過剰発現することを見出した。そこで、SCLC における CADM1 の役割について解析した。

2. 研究の目的

IgCAM に属する CADM1 は、上皮性癌の抑制、ATL の浸潤、精子形成、神経接着、免疫応答などの各局面で高い生理的、病理的活性を有する特色ある分子である。この CADM1 が ATL と同様に SCLC においても過剰発現することに着目し、SCLC の浸潤、転移に関わる CADM1 の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

In vitro の実験は SCLC 細胞株 16 例と NSCLC 細胞株 10 例を用いた。原発性肺癌手術検体の免疫組織化学染色は SCLC 34 例、NSCLC 25 例を用いた。

In vivo の実験は BALB/c-nu マウスの皮下に SCLC 細胞株を注射し、腫瘍形成能を比較する実験系を用いた。

肺癌細胞株における CADM1 の発現は real-time RT-PCR 法及び Western blot 法を用いて検討した。

CADM1 のスプライシングバリエーションの解析は、RT-PCR 法及び SSCP 法、シーケンシング法を用いて行った。

CADM1 の機能解析は、スプライシングバリエーションを発現させたベクターをトランスフェクションした細胞株を用い、cell aggregation assay 等を行った。

原発性肺癌手術検体の解析は、免疫組織化学染色法及び SSCP 法を用いて行った。

4. 研究成果

26例の肺癌細胞株におけるCADM1の発現をreal-time RT-PCR法で調べたところ、正常肺に比較してNSCLC細胞株では10例中10例全てで発現が低下または消失するのに対し、SCLC細胞株では16例中14例と高頻度に過剰発現することを見出した。また、Western blot法では、タンパク質でも同様にSCLC細胞株で高頻度にCADM1の強い発現を認めた。さらに、Western blot法においてCADM1はbroad signalを示すため、糖鎖修飾を疑ってN-glycosidase Fで処理すると、分子量の減少を認めた。従って、CADM1はN型糖鎖修飾を受けていることが分かった。

次に、SCLCで発現するCADM1は正常肺や正常脳では認めない特異的なスプライシングを受けていることを新たに見出した。CADM1は膜貫通部直上をコードするEx8-10に6つのバリエーションが存在し、NSCLCでは以前から報告されている遺伝子産物v8が発現しているのに対し、SCLCではv8に加えてv8/9という特異的なバリエーションが存在していた。v8/9はSCLC細胞株16例のうち、接着非依存性増殖をする浮遊細胞14例の全てにおいて発現するが、接着依存性増殖をする接着細胞2例では発現していなかった。さらにこのv8/9は外科切除されたSCLC組織検体で確認され、マウス正常組織では精巢のみに発現し、様々な癌細胞株47例の検索では胎児性癌にのみ発現しており、癌精巢抗原候補分子となる可能性が示唆された。

機能解析では、CADM1バリエーションを強制発現させたSCLC細胞では二価陽イオン非依存的に細胞凝集が有意に促進され、対照的にsiRNAによりCADM1発現を抑制したSCLC細胞では球状細胞集塊の形成

が抑制された。さらにCADM1バリエーションを強制発現させたSCLC細胞ではマウスでの腫瘍形成能が亢進することを見出し、CADM1がSCLCの悪性増殖や転移能と強く相関している可能性が示唆された。

外科切除されたSCLC34例とNSCLC25例においてCADM1の免疫組織化学染色を行ったところ、SCLCは34例中24(71%)が強陽性、7例(21%)が弱陽性、3例(9%)が陰性であった。一方、NSCLCは25例中2例(8%)が強陽性、10例(40%)が弱陽性、13例(52%)が陰性であり、組織型によって有意な染色性の違いを認めた。臨床病理学的に検討するとNSCLCでは、CADM1発現消失はsmoking indexが800以上の重喫煙者に有意に多かった。また、SCLCでは、CADM1の過剰発現は外科切除された患者の予後不良と有意な相関を示した。

本研究により、SCLCで特異的に発現するCADM1のスプライシングバリエーションを新たに見出した。CADM1の接着非依存性増殖に関わるこのバリエーションは、SCLCの診断マーカー及び予後因子となる可能性が示唆された。またこの研究により、SCLCの浸潤、転移におけるCADM1の意義が、Tiam1-Racなどの下流分子とともに明らかになりつつある。従って、CADM1の分子経路がSCLCの浸潤、転移を抑制する分子標的として、今後確立されることが期待される。

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1件)

Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, et al. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell

lung cancer. Cancer Science, Jun;103(6), 2012, 1051-1057. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02277.x. 査読有.

〔学会発表〕(計 5件)

菊池慎二, 南優子, 河村知幸, 他. 外科的切除を受けた小細胞肺癌患者における CADM1 過剰発現と予後との関連: 第 56 回日本肺癌学会学術集会, 2015 年 11 月 26-28 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

Shinji Kikuchi, Miwako Iwai, Mika Sakurai-Yageta, et al. Overexpression of CADM1 is associated with poor prognosis in small cell lung cancer: 16th World Conference on Lung Cancer, Sep 6-9, 2015. Denver, Colorado, USA

菊池慎二, 南優子, 柳原隆宏, 他. 原発性肺癌における CADM1 発現の臨床病理学的検討: 第 55 回日本肺癌学会学術集会, 2014 年 11 月 14 日, 京都

Shinji Kikuchi, Yuko Minami, Yusuke Saeki, et al. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer: 15th World Conference on Lung Cancer, Oct 29, 2013. Sydney Convention and Exhibition Centre. Sydney, Australia

菊池慎二, 北沢伸祐, 小林敬祐, 他. 細胞接着分子 CADM1 は小細胞肺癌において接着非依存性増殖に関与する: 第 53 回日本肺癌学会総会, 2012 年 11 月 9 日, 岡山コンベンションセンター他(岡山市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池慎二 (KIKUCHI, Shinji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 80588971

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: