

ヒト肺腺がんのゲフィチニブ耐性機構における
細胞接着分子 **CADM1** の意義

桑野 秀規

ヒト肺腺がんのゲフィチニブ耐性機構における
細胞接着分子 **CADM1** の意義

東京大学大学院博士課程
医学系研究科外科学専攻
指導教官 中島 淳 教授

桑野 秀規

目次

	頁
要旨	1
序文	2-33
材料と方法	34-40
結果	41-61
考察	62-71
結論	72
謝辞	73
参考文献	74-88

要旨

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブは *EGFR* 変異をもつ肺腺癌に著効を示すが多くは耐性を獲得する。我々は肺癌抑制分子 CADM1 が MET シグナルを抑制することを見出したため、耐性機構における CADM1 の意義を検討した。まず、ゲフィチニブ感受性肺腺癌細胞 HCC827 で認めた CADM1 の発現が、*MET* 増幅により耐性を示す HCC827 由来細胞 GR5、GR6 では欠如していた。次に GR5 に CADM1 を発現させるとゲフィチニブ感受性が回復した。一方、CADM1 発現は T790M 変異による耐性には影響しなかった。CADM1 は MET 経路の抑制を介してゲフィチニブ感受性を回復させる可能性が示された。

序文

現在、肺がんは日本人のがん死の原因の第 1 位を占めている。1986 年には全がん死亡者数 191,654 人中、肺がんによる死亡者数は 29,535 人であり、その割合も 15.4%を占めていたが、年々増加の一途を辿り、2011 年の厚生労働省の集計では、全がん死亡者数 357,305 人中、70,293 人が肺がんによって死亡し、その全がん死亡者数に占める割合も 19.6%と増加している (図 1) [1]。このように、肺がんによる死亡者数とその割合は増加しており、したがって肺がんが社会に与える影響は極めて大きく、肺がんの予防、並びに肺がんによる死亡の克服の社会的意義は高いと考えられる。

まず、初めに非小細胞肺がん (Non-small cell lung cancer ; NSCLC) の治療方針の概略について述べる。肺癌取扱い規約改定第 7 版によると [2]、肺がんの進行度は、がんの大きさや広がりによって分類される。まず、T 分類はがんの腫瘍径や腫瘍から周囲への浸潤、同一肺葉内への転移によって分類される。N 分類はリンパ節転移の進展によって分類され、M 分類は遠隔転移や対側の肺葉の腫瘍結節、悪性胸水の有無等によって分類される (表 1)。この TNM 分類によって肺がんの病期が潜伏癌、0 期、IA 期、IB 期、IIA 期、IIB 期、IIIA 期、IIIB 期、IV 期に決定される (表 2)。肺がん治療ガイドライン 2005 年度版 [3] によると、臨床病期 I、II 期は限局性の進展のみと考えられるため、標準治療は手術と考えら

れ従来からリンパ節郭清を含めた肺葉切除以上の手術が推奨されている。術後の病理診断にて肺癌取扱い規約第 7 版における pT1bN0M0 の病理病期 IA 期と病理病期 IB 期から IIB 期の症例では術後化学療法が有効とされている。切除可能な臨床病期 IIIA 期は手術を含めた集学的治療を行うが、手術単独療法を勧めるだけの根拠はなく、外科医を含めた集学的治療グループの検討が必要と考えられる。また、臨床病期 IIIB 期以上について手術療法は推奨されておらず、化学放射線療法等が治療として選択される。

非小細胞肺癌の切除症例数と治療成績を、それぞれ 1999 年と 2004 年において比較すると (肺癌取扱い規約第 6 版による分類)、全病理病期において治療成績は向上しており、また、小型肺癌でリンパ節転移や遠隔転移を認めない病理病期 IA 期の切除数が増加する一方で、病理病期 IIA 期以上の進行がんの手術数が減少していた (表 3)。さらに、手術関連死や原病死の割合も減少していた (表 4) [4]。これらは、画像診断等の診断技術の発達により肺がんの早期発見が可能になったことや、高齢者等の全身状態不良患者に対する手術の安全性や周術期管理法が向上したこと、そして進行がんや再発転移症例に対する化学療法を始めとした集学的治療の発達によると考えられた。

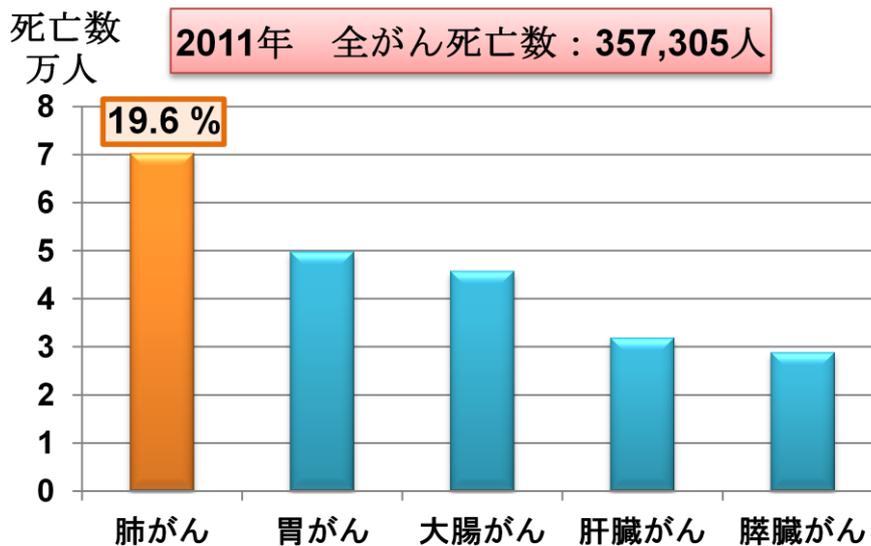
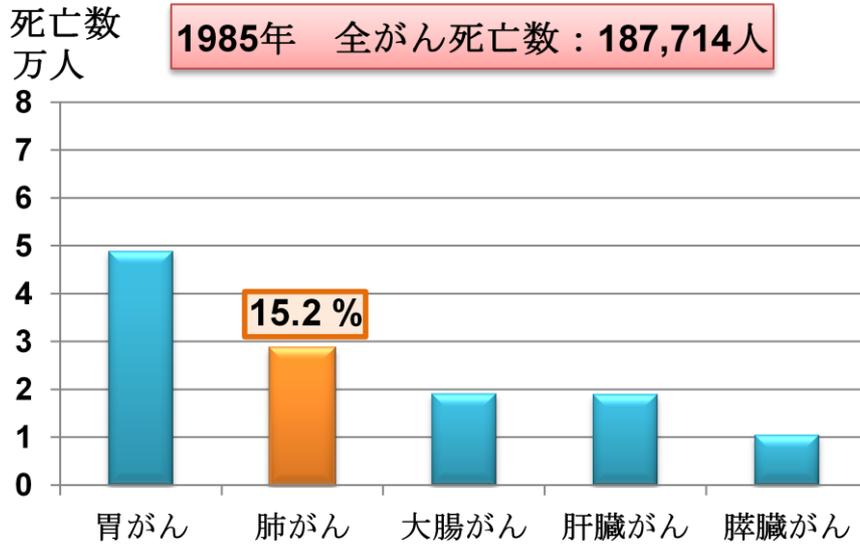


図1. 1985年と2011年における肺がん死亡者数とその割合【文献1を基に作成】

(A) 1985年の肺がんによる死亡者は2,9535人であり、全がん死亡者数187,714人の15.2%を占めていた。

(B) 2011年には肺がん死亡者数は70,293人に増え、全がん死亡者数357,305人の19.6%を占めていた。

表 1：肺がんにおける TNM 分類 [文献 2]

TX	原発腫瘍の存在が判定できない, あるいは, 喀痰または気管支洗浄液細胞診でのみ陽性で画像診断や気管支鏡では観察できない
T0	原発腫瘍を認めない
Tis	上皮内癌 (carcinoma in situ)
T1	腫瘍最大径 ≤ 3 cm, 肺か臓側胸膜に覆われている, 葉気管支より中枢への浸潤が気管支鏡上なし(すなわち主気管支に及んでいない)
T1a	腫瘍最大径 ≤ 2 cm
T1b	腫瘍最大径 > 2 cm でかつ ≤ 3 cm
T2	腫瘍最大径 > 3 cm でかつ ≤ 7 cm, または腫瘍最大径 ≤ 3 cm でも以下のいずれかであるもの (T2a) <ul style="list-style-type: none"> ・主気管支に及ぶが気管分岐部より≥ 2 cm 離れている ・臓側胸膜に浸潤 ・肺門まで連続する無気肺か閉塞性肺炎があるが一側肺全体には及んでいない
T2a	腫瘍最大径 > 3 cm でかつ ≤ 5 cm, あるいは ≤ 3 cm で胸膜浸潤有り (PL1, PL2, 葉間の場合は PL3)
T2b	腫瘍最大径 > 5 cm でかつ ≤ 7 cm
T3	最大径 > 7 cm の腫瘍; 胸壁 (superior sulcus tumor を含む), 横隔膜, 横隔神経, 縦隔胸膜, 心嚢のいずれかに直接浸潤; 気管分岐部より 2 cm 未満の主気管支に及ぶが分岐部には及ばない; 一側肺に及ぶ無気肺や閉塞性肺炎; 同一葉内の不連続な副腫瘍結節
T4	大きさを問わず縦隔, 心, 大血管, 気管, 反回神経, 食道, 椎体, 気管分岐部への浸潤, あるいは同側の異なった肺葉内の副腫瘍結節
NX	所属リンパ節評価不能
N1	同側の気管支周囲かつ / または同側肺門, 肺内リンパ節への転移で原発腫瘍の直接浸潤を含める
N2	同側縦隔かつ / または気管分岐部リンパ節への転移
N3	対側縦隔, 対側肺門, 同側あるいは対側の前斜角筋, 鎖骨上窩リンパ節への転移
MX	遠隔転移評価不能
M0	遠隔転移なし
M1	遠隔転移がある
M1a	対側肺内の副腫瘍結節, 胸膜結節, 悪性胸水 (同側, 対側), 悪性心嚢水
M1b	他臓器への遠隔転移がある

表 2：肺がんにおける病期分類 [文献 2]

潜伏癌	TX	N0	M0
0 期	Tis	N0	M0
IA 期	T1a または T1b	N0	M0
IB 期	T2a	N0	M0
IIA 期	T1a または T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB 期	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA 期	T1a または T1b	N2	M0
	T2a	N2	M0
	T2b	N2	M0
	T3	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIB 期	Any T	N3	M0
	T4	N2	M0
IV 期	Any T	Any N	M1a または M1b

表 3: 日本における肺がん切除症例の病理病期と 5 年生存率の変遷 [文献 4 より
改変]

肺癌取り扱い規約第 6 版による

	1994 年		2004 年	
	n (%)	5 年生存率 (%)	n (%)	5 年生存率 (%)
合計	7,238 (100)		11,663 (100)	
P-stage				
IA	2,142 (30.4)	79.2	5,611 (48.1)	85.9
IB	1,488 (21.1)	60.1	2,398 (20.4)	69.3
IIA	261 (3.7)	58.6	336 (2.9)	60.9
IIB	785 (11.1)	42.2	977 (8.4)	51.1
IIIA	1,337 (19.0)	28.4	1,354 (11.6)	41.0
IIIB	759 (10.8)	20.0	799 (6.9)	36.7
IV	275 (3.9)	19.3	188 (1.6)	27.8

表 4：日本における肺がん手術関連死亡数と原病死数の変遷 [文献 4 より改変]

	1994 年	2004 年
	n (%)	n (%)
合計	7,393 (100)	11,663 (100)
手術死(≤30 日)	101 (1.4)	48 (0.4)
在院死(>30 日)	122 (1.7)	46 (0.4)
原病死	2,635 (35.6)	2,459 (21.1)

近年、分子生物学の進歩により、肺がんの細胞分子に多数の遺伝子変異が同定されてきている。その中で、特に細胞増殖促進の鍵となり、発がんやがんの進展に関わる遺伝子変異は、“driver mutation”と呼ばれ、このような遺伝子変異を持つ遺伝子をがん遺伝子と呼ぶ。また、発がんやがんの進展に関わる遺伝子変異を受ける前の遺伝子をがん原遺伝子と呼ぶ。さらに、“driver mutation”を持つがん遺伝子がコードする分子を標的とした分子標的治療薬が治療に有効であることが示されてきた [5,6]。このようながん遺伝子は、肺がんにおいては特に肺腺がんについてよく研究されており、肺腺がんの代表的ながん遺伝子として、*EGFR* 遺伝子変異、*KRAS* 遺伝子変異、*MET* 遺伝子変異、*ALK-EML4* 融合遺伝子、*HER2* 遺伝子変異、*KIF5B-RET* 融合遺伝子、*BRAF* 遺伝子変異などが存在し (図 2) [7,8,9]、それぞれに分子標的治療薬が開発されている (表 5) [8]。

Katayama らは肺腺がんの術後再発症例を、*EGFR* 遺伝子変異の有無によりゲフィチニブを投与した群と、化学療法など従来の治療を行った群に分け、後ろ向きに予後の検討を行った (図 3) [10]。その結果、*EGFR* 遺伝子変異陽性でゲフィチニブの投与を行った群は、*EGFR* 遺伝子変異陽性で従来型の治療を行った群より、有意にその全生存期間 (Overall survival: OS) は良好であった。また、*EGFR* 遺伝子変異陽性でゲフィチニブを投与した群は、*EGFR* 遺伝子変異陰性でゲフィチニブを投与された群と比較して有意にその全生存期間が良好であった。さら

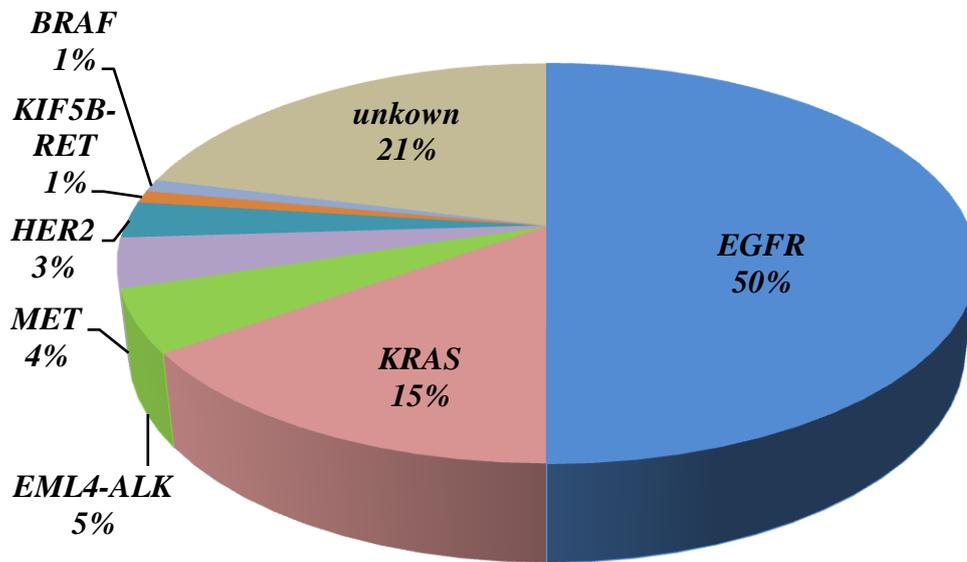


図 2. 日本人の肺腺がんにおける代表的な遺伝子変異とその割合 [文献 8、9 より改変]

肺腺がんの代表的ながん遺伝子として、*EGFR* 遺伝子変異、*KRAS* 遺伝子変異、*MET* 遺伝子変異、*ALK-EML4* 融合遺伝子、*HER2* 遺伝子変異、*KIF5B-RET* 融合遺伝子、*BRAF* 遺伝子変異などが存在する。

表 5 : 肺腺がんにおける代表的な標的分子と分子標的治療薬 [文献 5,6,7,8 より改変]

標的分子	分子標的治療薬
EGFR	ゲフィチニブ エルロチニブ セツキシマブ
KRAS	未開発
EML4-ALK	クリゾチニブ
MET	チバンチニブ アファチニブ
HER2	トラスツズマブ
KIF5B-RET	バンデタニブ
BRAF	未開発

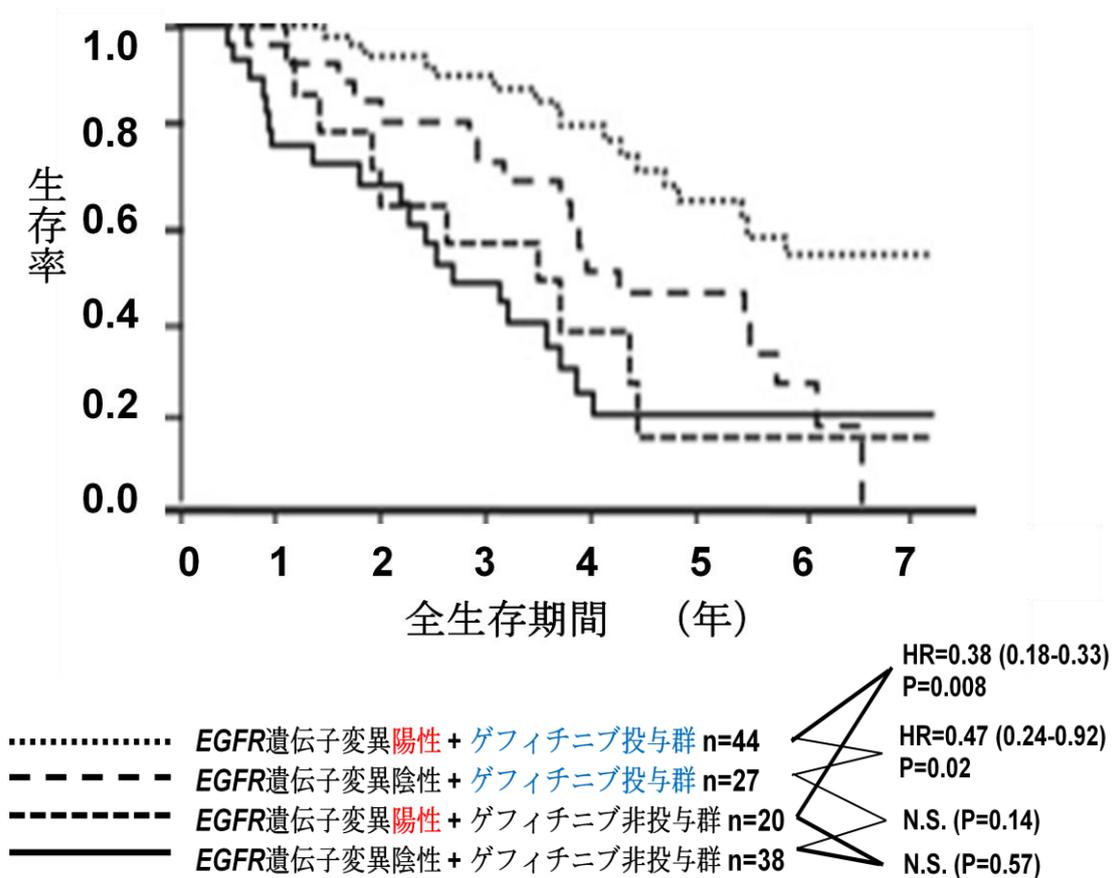


図 3. 肺腺がん術後再発症例における *EGFR* 遺伝子変異と治療法別予後の関係 [文献 10]

EGFR 遺伝子変異陽性の再発症例においてゲフィチニブ投与群は、非投与群と比べ有意にその全生存期間は良好だった。一方で、ゲフィチニブ投与群において、*EGFR* 遺伝子変異陽性の症例は、*EGFR* 遺伝子変異陰性の症例と比べ、有意に全生存期間が良好だった。また、*EGFR* 遺伝子変異陰性症例においては、ゲフィチニブ投与群と非投与群の間の全生存期間に有意な差は認めなかった。ゲフィチニブ投与群において、*EGFR* 遺伝子変異陽性症例と陰性症例の間の全生存期間に有意な差は認めなかった。

に、*EGFR* 遺伝子変異陰性症例においては、ゲフィチニブ投与群と非投与群の間の全生存期間に有意な差は認めなかった。ゲフィチニブ非投与群においては、*EGFR* 遺伝子変異陽性症例と陰性症例の間の全生存期間に有意な差は認めなかった。これらの結果から、切除された肺腺がんの遺伝子変異の有無を検索することにより症例を選べば、分子標的治療薬は再発症例の予後を改善させうることが示唆された。以上より近年、分子標的治療薬は肺腺がんに対する集学的治療の選択肢の一つとして大きな注目を浴びている。

そこでまず、肺腺がんの標的分子として最も重要な、上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor; *EGFR*) について説明する。*EGFR* は、1186 アミノ酸から成る、膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼ (Receptor of tyrosine kinase; *RTK*) で、細胞外ドメイン、膜貫通型ドメイン、細胞内ドメインの3つで構成されている (図 4) [11]。代表的な *EGFR* のリガンドは上皮成長因子 (Epidermal growth factor; *EGF*) である。*EGF* などのリガンドが *EGFR* の細胞外ドメインに結合すると、同一分子、もしくは他の *ERBB* ファミリーと二量体を形成する。この後、細胞内ドメインのチロシンキナーゼが互いのチロシン残基をリン酸化し合うことにより活性化される。その後、そのリン酸基に *Grb2* (growth factor receptor bound protein 2)、*Shc* (src homology and collagen) 等の特異的なアダプタータンパク質が結合し、さらに下流の *PI3K-AKT* 経路や *RAS-RAF-MAPK*

経路を活性化させ、細胞の生存や増殖に寄与すると言われている [12]。EGFR は様々ながんで過剰発現が見られ [13]、予後不良因子とされている [14]。

ゲフィチニブは EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-tyrosine kinase inhibitor; EGFR-TKI) として開発され、日本においては 2002 年から使用が開始された (図 5)。特に、ゲフィチニブを始めとした EGFR-TKIs は、野生型 EGFR と比較して EGFR チロシンキナーゼ領域に後天性変異を持つ EGFR に対し、より高い親和性を示すことが、2004 年に報告された二つの論文 [15,16] で明らかになった。

一方で、この *EGFR* 遺伝子変異はリガンドに非依存的に EGFR を活性化し、細胞生存シグナルや、細胞増殖シグナルを無秩序に伝達することでがんの発生や進行に関わると言われている (図 6) [5]。ゲフィチニブは EGFR チロシンキナーゼ領域の ATP 結合部位において ATP と競合的に結合することで、EGFR とその下流分子の活性を抑制し抗腫瘍効果を発揮する (図 7) [11,17]。

Mitsudomi らはこのチロシンキナーゼ領域の *EGFR* 遺伝子変異を文献例の 569 例より解析したところ、*EGFR* 遺伝子変異の部位と種類はエクソン 18 の点突然変異、エクソン 19 の欠失変異、エクソン 20 の挿入変異、エクソン 21 の点突然変異の 4 種に大きく分けられた。このうちエクソン 19 のコドン 746-750 を中心とする部位の欠失変異 (48.2%) と、エクソン 21 のコドン 858 において T から G

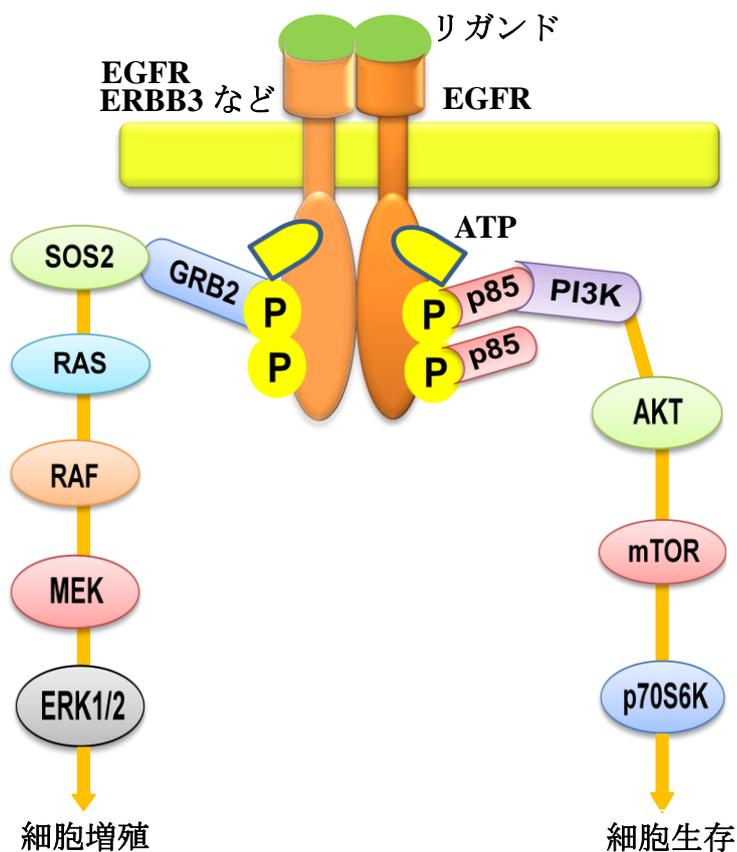


図 4. EGFR によるシグナル伝達 [文献 11 より改変]

EGFR は細胞膜を貫通する受容体タンパク質である。チロシンキナーゼの ATP 結合部位において EGFR-TKI は ATP と競合阻害する。受容体に増殖因子 (リガンド) が結合の後、図に示すような二量体形成がおこり、ATP のリン酸基が調節ドメインのチロシン残基に移される。このリン酸化チロシンに種々のタンパク質が結合していき次々と下流のタンパク質が活性化されていく。とくに重要なのが図に示した RAS -RAF -MAP K 経路と PI3K- AKT 経路である。

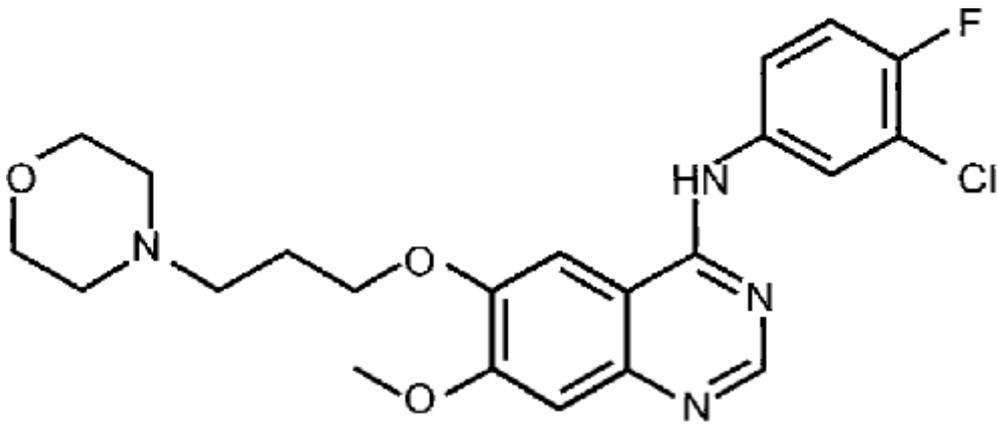


図 5. ゲフィチニブ (Iressa®) の構造 [文献 17]

ゲフィチニブは白色 - 黄白色の粉末で、IUPAC 命名法では、*N*-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)quinazolin-4-amine、CAS 登録番号は 184475-35-2 である。化学式は $C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$ 。モル質量は 446.902 g/mol である。

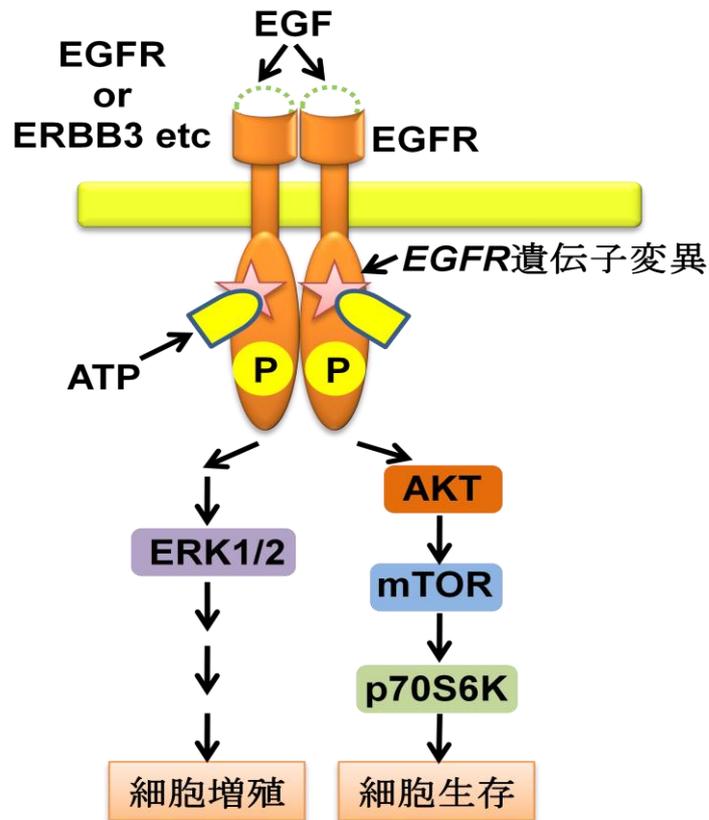


図 6. EGFR 遺伝子変異とその下流分子経路 [文献 11 より改変]

EGFR チロシンキナーゼ領域に遺伝子変異を持つ EGFR は、EGF などのリガンド非依存的に活性化し、EGFR やその他の ERBB ファミリー受容体と二量体を形成する。その後、PI3K-AKT 経路や RAS-RAF-MAPK 経路の分子を活性化し、細胞増殖や細胞生存に関わるシグナルを無秩序に伝達することで、がん化やがんの進展に関わる。

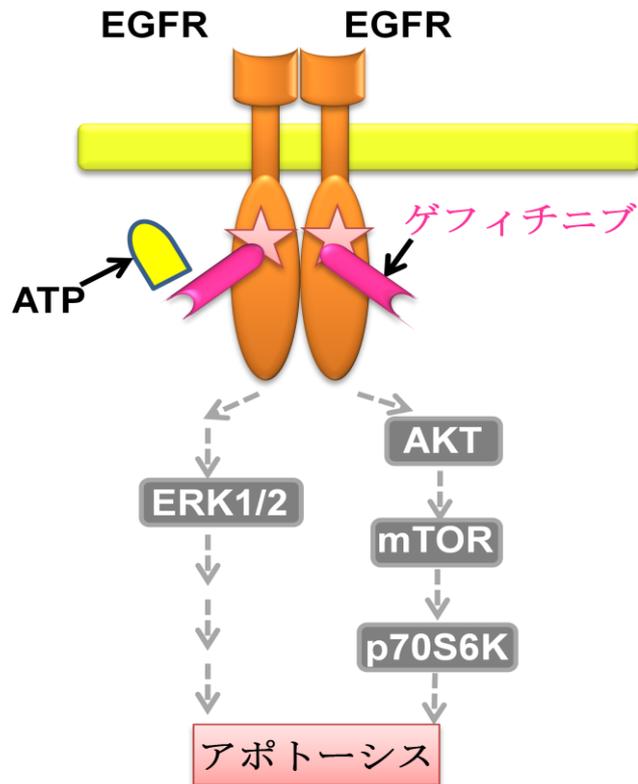


図 7. EGFR-TKIs の分子作用機序 [文献 11 より改変]

ゲフィチニブをはじめとした EGFR-TKIs は ATP と競合して ATP 結合部位に結合することで EGFR のリン酸化を阻害し、PI3K-AKT 経路や RAS-RAF-MAPK 経路の様々な分子を抑制することで、アポトーシスを誘導する。特に EGFR-TKIs は EGFR チロシンキナーゼ領域の遺伝子変異を持つ EGFR に対し、高い親和性を示す。

への塩基転換が起こった結果、ロイシンからアルギニンに変化する (L858R) 点突然変異 (42.7%) の二つで 90%以上を占めていた (図 8A) [18]。さらに、この変異の種類は奏効率にも影響を与えている。Mitsudomi らは *EGFR* 遺伝子変異の種類と *EGFR*-TKIs の奏効率の関係を 327 例の症例を解析した結果、エクソン 19 の欠失変異の奏効率は 84%、L858R は 71%、エクソン 18 の点突然変異 (G719X) は 56%、エクソン 20 の挿入変異に対する奏効率は 0%であることを明らかにした (図 8B) [19]。

このように、*EGFR* は肺腺がんの治療における重要な標的分子である。一方で、臨床上的大きな問題点として、*EGFR*-TKIs 奏効例の多くは 1-2 年以内に耐性を獲得してしまうことが挙げられる [20,21]。*EGFR*-TKIs への耐性獲得の主な機序は、Engelman らによる 37 例の解析により大きくわけて以下の 4 つ報告されている [22]。1) コドン 790 のスレオニンがメチオニンに変化 (T790M) したことにより、ATP 結合部位の立体構造の変化を来し、*EGFR*-TKIs の親和性が低下し耐性を獲得するもの [23] が、全体の 49% を占めていた。2) *MET* 遺伝子増幅による *MET* 過剰発現が *EGFR* に非依存的に *ERBB3* を活性化することで、がん細胞の生存、増殖を促進するものが、全体の 5% に認められた。また、この耐性化は、他の報告では 22% としているものもある [24]。3) 全体の 14% に肺腺がんが *SCLC* へと形質転換することで、耐性を獲得する症例が認められた。4) 5%

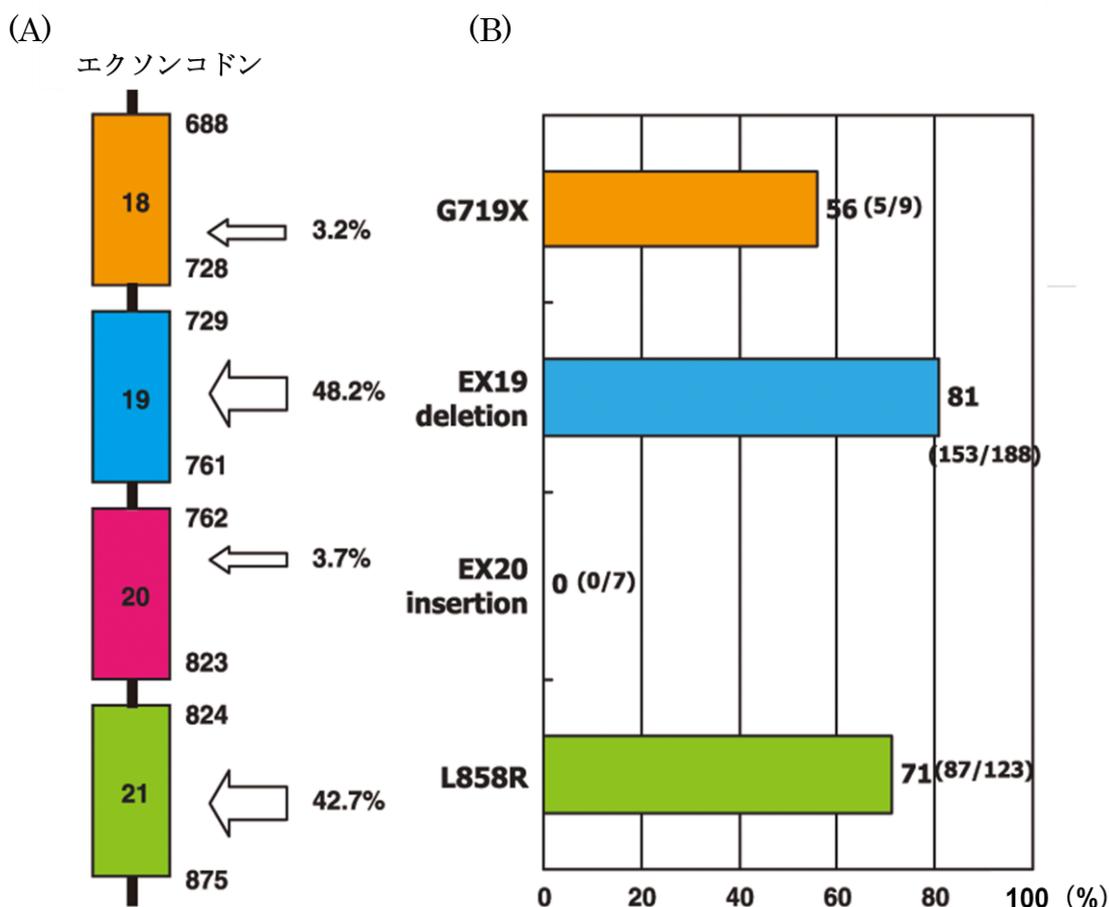


図 8. *EGFR* 遺伝子変異の種類と *EGFR*-TKIs に対する奏効率 [文献 18,19 より改変]

(A) 569 例の文献例を解析した結果、*EGFR* 遺伝子変異の部位と種類はエクソン 18 の点突然変異、エクソン 19 の欠失変異、エクソン 20 の挿入変異、エクソン 21 の点突然変異の 4 種に大きく分けられた。このうちエクソン 19 のコドン 746-750 を中心とする部位の欠失変異 (48.2%) と、エクソン 21 のコドン 858 において T から G への塩基転換が起こった結果、ロイシンからアルギニンに変化する (L858R) 点突然変異 (42.7%) の二つで 90% 近くを占めていた。

(B) 327 例の症例を解析した結果、エクソン 19 の欠失変異の奏効率は 84%、L858R は 71%、エクソン 18 の点突然変異 (G719X) は 56%、エクソン 20 の挿入変異に対する奏効率は 0% であった。

の症例では *PIK3CA* 変異により恒常的に PI3K を活性化し、PI3K-AKT 経路を活性化させることで、耐性を獲得していた。

次に、EGFR-TKIs に対し耐性化を引き起こす原因分子の一つである、MET について説明をする (図 9)。膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼである MET は、化学発がん骨肉腫細胞株から同定されたがん原遺伝子であり [25]、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) をリガンドとしている。MET タンパク質は 50 kDa の α 鎖と 140 kDa の β 鎖からなり、その構造は、 β 鎖にチロシンキナーゼドメイン、膜貫通ドメインならびに細胞外ドメインを持ち、その β 鎖の細胞外ドメインに α 鎖が結合したヘテロダイマー構造をとる [26-28]。MET は、HGF の結合により細胞内の複数のリン酸化部位が自己リン酸化され、細胞内領域において Gab1 や Grb2、PI3 キナーゼの p110 や p85 サブユニットなど、様々な分子と結合することによりリン酸化シグナルを伝達する [29]。この中で、自己リン酸化部位である Tyr 1003 の部位は c-Cbl を介したユビキチン化と MET 自体の分解に重要である [30]。さらに、Tyr 1349 や Tyr1356 のリン酸化が Gab1 や Grb2 など結合分子を介して、PI3K-AKT 経路や RAS-RAF-MAPK 経路へとシグナルを伝え、細胞の増殖・分化やアポトーシスの制御、細胞周期の制御など多様な機能に関わることが知られている [31,32]。MET は主に上皮細胞に発現し、肝臓や腎臓に特に多く見られ、消化管や前立腺、精嚢、乳腺にも発現を認める。ヒ

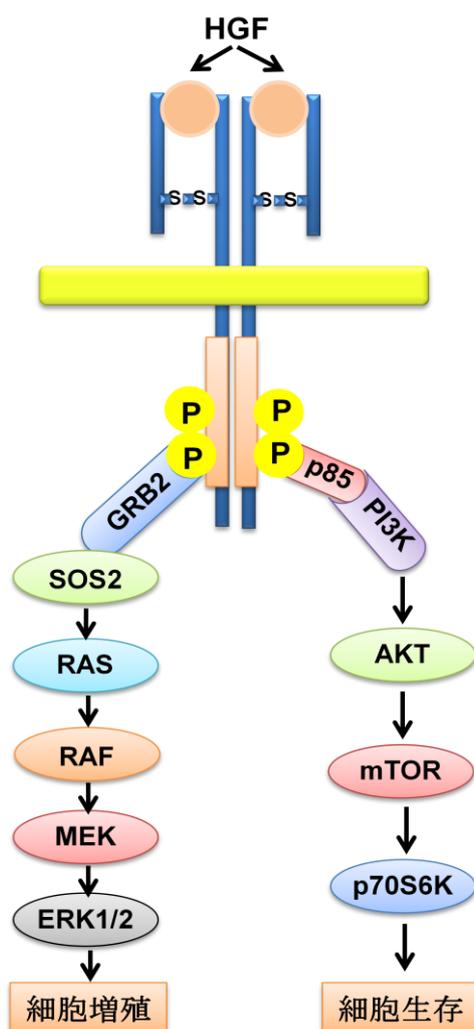


図 9. 受容体型チロシンキナーゼ MET とシグナル伝達 [文献 26-32 より改変]

膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼである MET は、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) を唯一のリガンドとしている。MET タンパク質は細胞外ドメインである 50 kDa の α 鎖と膜貫通ドメインである 140 kDa の β 鎖がジスルフィド結合を介し結合している。MET は、HGF の結合により細胞内の複数のリン酸化部位が自己リン酸化され、PI3K-AKT 経路や RAS-RAF-MAPK 経路へとシグナルを伝え、細胞の増殖・分化やアポトーシスの制御、細胞周期の制御など多様な機能に関わることが知られている。

ト非小細胞肺癌においては、約 40-70% に *MET* 遺伝子増幅による *MET* の過剰発現が認められ、がんの進展に関与していると報告されている [33]。

非小細胞肺癌の進展に関与する機構として、*MET* 遺伝子増幅の他に、がん抑制遺伝子 *CADMI* (*Cell Adhesion Molecule 1*) / *TSLC1* (*Tumor Suppressor Lung Cancer 1*) が、そのプロモーター領域のメチル化によって不活化されることが知られている [34,35]。そこで、次に *CADMI* 遺伝子、及び *CADMI* と *MET* の関係について説明をする。

CADMI 遺伝子は、第 11 染色体上にヒト NSCLC のがん抑制遺伝子として同定された [36]。1992 年に Satoh らにより、第 11 染色体長腕の片側を欠損したヒト非小細胞がん細胞株 A549 に第 11 染色体を移入することにより、ヌードマウス皮下における腫瘍原性が抑えられることが既に示されていた [37]。この機能的相補法を用いて、欠損領域のうちどの領域が腫瘍原性の抑制に必要かどうかを調べたところ、*CADMI* 遺伝子を含む 11q23.2 の約 100 kb 領域にその抑制活性を見出し、この領域の構造解析により *CADMI* 遺伝子は同定された [36]。

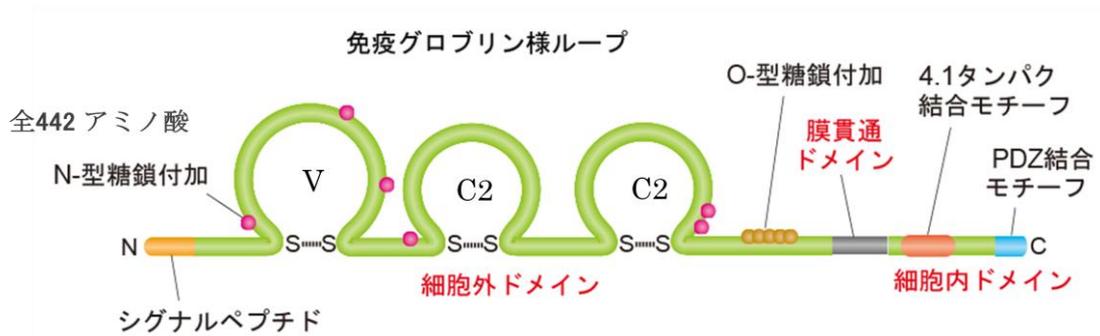
CADMI 遺伝子は免疫グロブリン・スーパーファミリーに属する 1 回膜貫通型タンパク質をコードする [38,39]。その分子は V-型、C2-型、C2-型の 3 個の免疫グロブリン様ループを持ち、442 アミノ酸からなる糖タンパク質である [40] (図 10A)。脳、精巣、肺、腎などの臓器で強い発現が認められる。そして *CADMI*

は、染色体 11q23 に存在し、NSCLC の 44%で不活化している NSCLC のがん抑制遺伝子である [39,41]。

CADM1 分子は上皮細胞の側面においてホモ二量体を形成し、隣接細胞のホモ二量体とトランス結合を形成する [40]。その細胞内ドメインには 4.1 結合モチーフ (FERM 結合モチーフ) および PDZ 結合モチーフを持ち、それぞれ 4.1 タンパク質群および膜結合性グアニレートキナーゼ群 (membrane-associated guanylate kinase homologue: MAGuKs) が結合する (図 10B)。4.1 タンパク質群のうちでは 4.1B / DAL-1 と 4.1N が CADM1 と結合することが示されている。この 4.1 タンパク質群は、アクチンやスペクトリンと結合し、細胞接着シグナルを細胞骨格へと伝える。また、この 4.1B 遺伝子は NSCLC の 57%でプロモーター領域のメチル化で不活化していることから [42]、CADM1-4.1B の分子経路は非小細胞肺がんの重要ながん抑制経路と考えられている。

そこで、所属研究室で *Cadm1* 欠損マウスを作製したところ、肺腫瘍の自然発生を認めた [43] (表 6)。その肺腫瘍の発生頻度を集計したところ、月齢 15 ヶ月にて 30 匹中 11 匹 (37%) で、月齢 18 ヶ月では 35 匹中 12 匹 (34%) で肺腫瘍を発生し、共に 30% 以上と高率に肺腫瘍の自然発生を認めた。その頻度は、野生型マウスが月齢 15 ヶ月にて 31 匹中 3 匹 (10%)、月齢 18 ヶ月では 30 匹中 2 匹 (7%) で肺腫瘍を発生したのに比べて、有意に高い結果となった (それぞれ

(A)



(B)

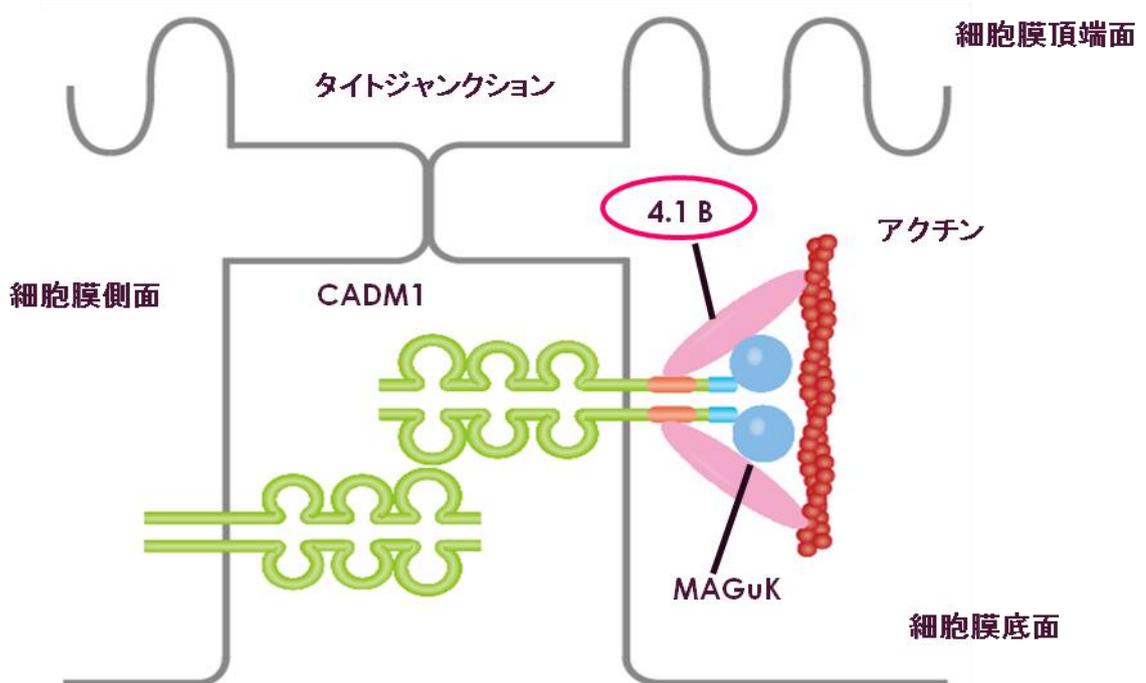


図10. CADM1 分子の構造(A) と上皮細胞における発現部位 (B) [文献40,43より改変]

(A) CADM1 分子は免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子群 (IgCAMs) に属する。V: variable type 免疫グロブリンループ、C2: constant type 免疫グロブリンループ

(B) CADM1 は上皮細胞では細胞膜側面に発現し、それぞれホモ二量体を形成して隣接細胞のホモ二量体とトランス結合する。細胞内では、アクチン結合タンパク質である 4.1 タンパク質群や、細胞の極性形成に関わる膜結合性グアニレート (MAGuK) 分子群と結合する。

表 6 : *Cadm1*^{-/-}マウス肺腫瘍における肺腫瘍の自然発生 [文献 43]

遺伝子型	担癌マウス数 / 解析マウス数	
	月齢 15 カ月	月齢 18 カ月
<i>Cadm1</i> ^{+/+}	3 / 31 (10%) (3 腺腫)	2 / 30 (7%) (3 腺腫)
<i>Cadm1</i> ^{-/-}	11 / 30 (37%) (11 腺腫, 1 腺がん)	12 / 35 (34%) (15 腺腫, 1 腺がん)

* : $p = 0.016$

** : $p = 0.013$

統計学的解析は Fisher exact probability test を使用した。

表 7 : *Cadm*^{+/+}マウス肺腫瘍と *CadmI*^{-/-}マウス肺腫瘍（月齢 15 カ月）におけるリン酸化 MET シグナルの亢進の頻度 [文献 43]

	リン酸化 MET 亢進腫瘍数 / 解析腫瘍数
<i>CadmI</i> ^{+/+}	0 / 3 (0%)
<i>CadmI</i> ^{-/-}	4 / 9 (44%)

$p=0.016$ 、 $p=0.013$)。腺がんと診断される悪性度の強い腫瘍は、*Cadm1*^{-/-}マウスのみに発生し、野生型マウスには認められなかった。さらに、リン酸化 MET (pTyr1003 および pTyr1234/1235) の発現を免疫染色にて検索したところ、*Cadm1*^{-/-}マウス正常肺組織においては全例で発現を認めなかったが、*Cadm1*^{-/-}マウス肺腫瘍では 9 例中 4 例 (44%) に、リン酸化 MET のシグナルを検出した。一方、野生型マウスの肺腫瘍 3 例では、リン酸化 MET のシグナルは検出されなかった (表 7)。このことから CADM1 の発現欠如が MET のリン酸化による下流へのシグナルの活性化を増強し、がんの発生や浸潤に関与する可能性が示唆された。

また、CADM1 と MET の関係については、培養細胞を用いた系でも検討されている。Masuda らは HGF 刺激による MDCK 細胞の上皮間葉転換を、CADM1 が実験的に抑制し、さらに HGF 刺激による Rac の一過性の活性化も抑えられたことを見出した [44]。これらのことより永田らは HGF 刺激による MET の活性化により促されるがんの発生や進行に対して、CADM1 が抑制的に作用するのではないかと考え、CADM1 の MET 分子経路への修飾の実態を、ヒト肺腺がん細胞株 A549 を用いて解析した [43]。まず、CADM1 タンパク質を過剰発現させた A549 細胞の細胞抽出物を抗 MET 抗体にて免疫沈降したところ、抗 CADM1 抗体によるウェスタン・ブロット法にて、予測される約 90 kDa の大き

さの位置に CADM1 が共沈することが確認された (図 11)。次に、CADM1 を過剰発現させた A549 細胞と、ベクター単独導入した A549 細胞に対し、HGF で MET を活性化させ、MET および AKT や mTOR などのその下流分子のリン酸化活性をウェスタンブロット解析にて検出した。CADM1 の発現により、これらのリン酸化活性が抑制されることが示された (図 12)。これらのことから、CADM1 は A549 細胞において MET と複合体を形成し (図 13A)、MET とその下流分子の活性を抑制することが示された (図 13B)。

ここで、MET 過剰発現によりゲフィチニブ耐性を獲得した肺腺がんについて着目した。MET 過剰発現によりゲフィチニブ耐性を獲得した肺腺がんは、MET から ERBB3 へ異常なシグナルが投射されており、EGFR に非依存的に細胞生存シグナルが ERBB3 を介して活性化されることが知られている (図 14A) [24]。また、前述の結果より、CADM1 は MET と複合体を形成し (図 13A)、MET とその下流分子の活性を抑制することが示された。これらのことから、MET 過剰発現によりゲフィチニブ耐性を獲得した肺腺がん細胞に CADM1 を外来性に強制発現させることにより、MET の活性を抑制し、ゲフィチニブに対する感受性を回復できるのではないかと仮説をたて実験を行った (図 14B)。

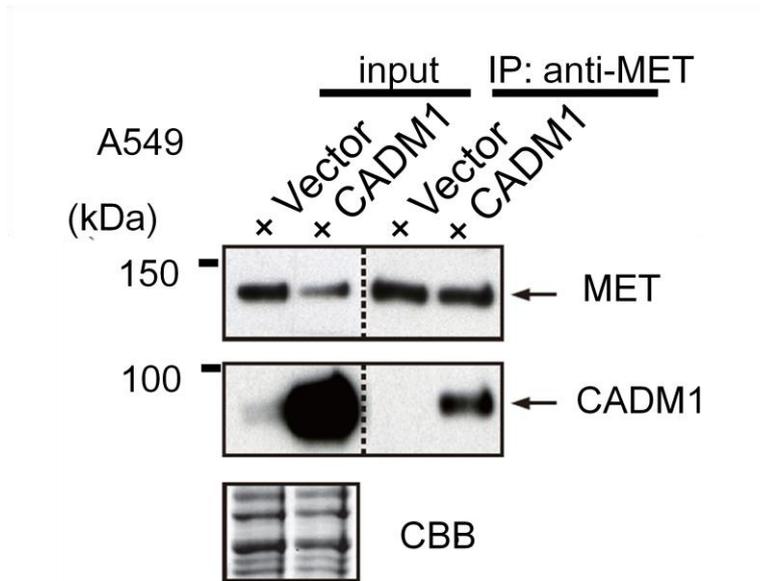


図 11. CADM1 は MET と複合体を形成する [文献 43 より改変]

CADM1 タンパク質を過剰発現させた A549 細胞の細胞抽出物を抗 MET 抗体にて免疫沈降したところ、抗 CADM1 抗体によるウエスタン・ブロット法で検出すると、予測される約 90 kDa の大きさの位置に CADM1 が共沈した。

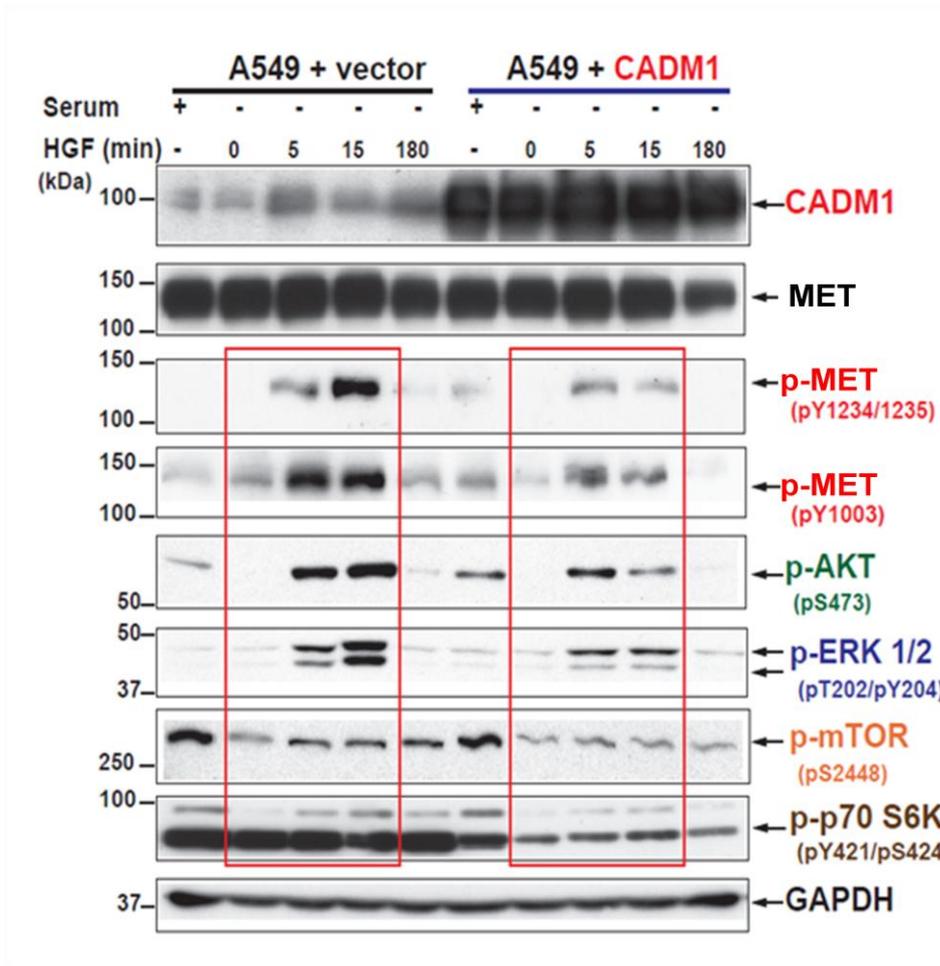


図 12. CADM1 は MET のリン酸化を抑制することで、その下流の様々な分子を抑制する [文献 43 より改変]

CADM1 を過剰発現させた A549 細胞と、ベクター単独導入した A549 細胞に対し、HGF で MET を活性化させ、MET および AKT、ERK1/2、mTOR、p70S6K のリン酸化活性をウェスタンブロット解析にて検出した。CADM1 を導入した A549 細胞の MET 下流分子のリン酸化活性は、ベクターを単独で導入した A549 細胞の MET 下流分子のリン酸化活性と比較し減弱することが示された。

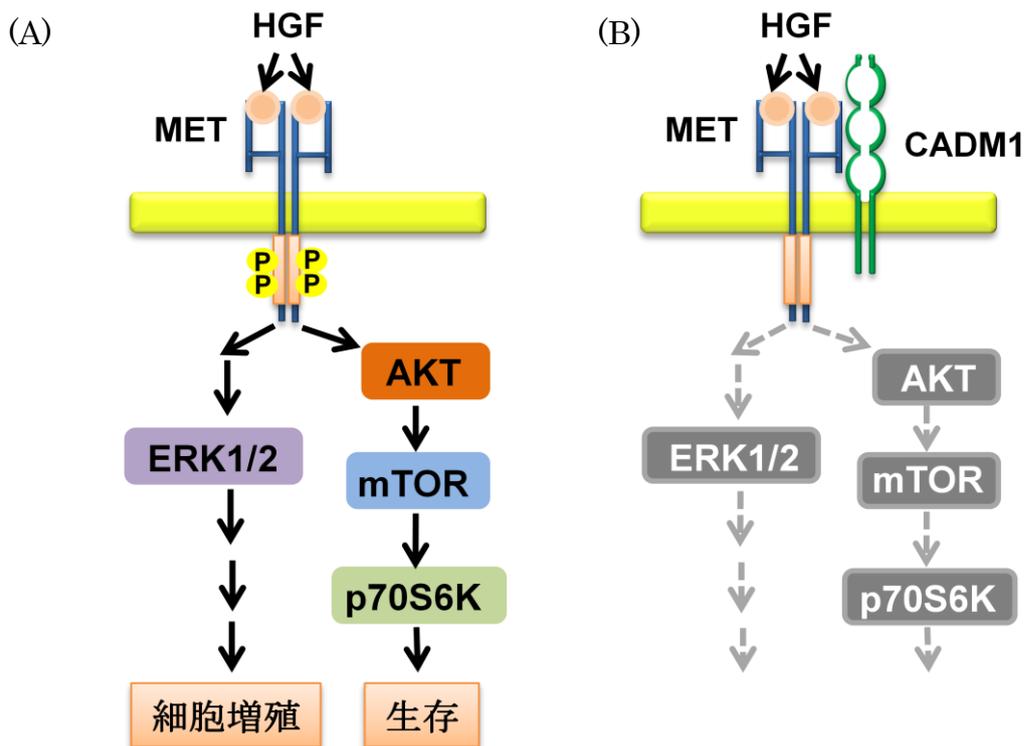


図 13. A549 細胞において CADM1 は MET のリン酸化活性を抑制することにより、下流シグナル分子活性を抑制する [文献 43 を基に作成]

(A) HGF によりリン酸化された MET は、そのチロシン残基をリン酸化し、下流の様々な分子を活性化させる。

(B) CADM1 は MET と複合体を形成し、MET のリン酸化活性を抑制することで下流分子の活性を抑制する。

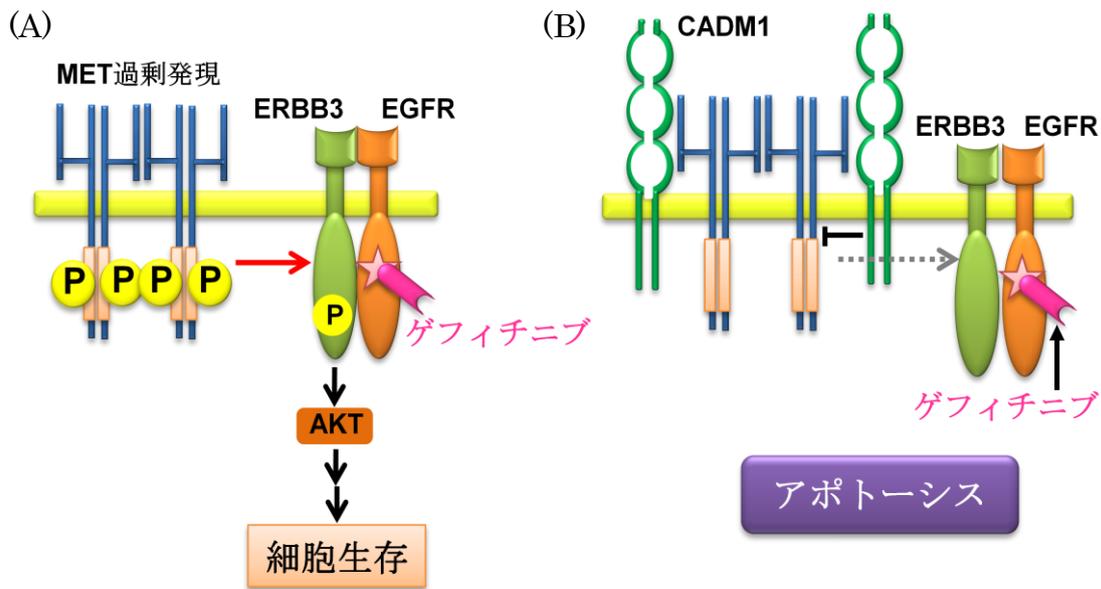


図 14. MET 過剰発現によるゲフィチニブ耐性獲得機構と CADM1 導入により予想されるゲフィチニブ感受性回復機序の模式図

(A) *MET* 遺伝子増幅による *MET* 過剰発現が *EGFR* に非依存的に *ERBB3* を活性化することで、*ERBB3* を介し生存シグナルを伝達し耐性を獲得する。
 (B) *CADM1* を外来性に導入することにより、*MET* の活性を抑制し、ゲフィチニブに対する感受性を回復すると推測した。

材料と方法

培養細胞

非小細胞肺癌細胞株 HCC827、HCC827GR5、HCC827GR6、PC9、PC9ZD は国立がん研究センター研究所 小泉 史明 遺伝医学研究分野 ユニット長、国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科 田村 研治 通院治療室 医長より頂いた。HCC827 細胞と PC9 細胞はヒト肺腺がんの細胞株で、エクソン 19 に欠失変異を持ち、ゲフィチニブに高い感受性を示す細胞株である。また、HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞は HCC827 細胞より得られた MET 過剰発現によりゲフィチニブ耐性を獲得した細胞株である [24]。また、PC9ZD 細胞は PC9 細胞より得られた T790M 遺伝子変異によりゲフィチニブ耐性を獲得した細胞株である [45]。HCC827-HGF1 細胞と HCC827-HGF2 細胞は近畿大医学部附属病院腫瘍内科 岡本 勇 准教授より頂いた。HCC827-HGF1 細胞と HCC827-HGF2 細胞は、悪性膠芽腫細胞である U87MG より全長ヒト HGF cDNA を得たのち、これを HCC827 細胞にトランスフェクションすることで、HGF を自ら分泌する細胞株である [46]。HCC827 細胞と PC9 細胞は推奨の通りに Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) に 10% ウシ胎児血清 (FBS) (BD Biosciences 社、Nuaille, France)、100 units/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Invitrogen 社、

Carlsbad, CA, USA) を添加した培地で培養した。HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞、PC9ZD 細胞は上記培養液に 1 μ M の Gefitinib (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA) を加え培養した。HCC827-HGF 細胞は上記培養液にハイグロマイシン 500 ng/ml を加え培養した。また、HCC827GR5 細胞と PC9ZD 細胞に CADM1 を導入した GR5/CADM1 細胞と PC9ZD/CADM1 細胞と、ベクター単独導入した HCC827V 細胞はそれぞれ G418 を 500 ng/ml 加え培養した。培養細胞は全て 37°C、5% CO₂ 下で培養した。

抗体

免疫沈降およびウエスタン・ブロット法に使用する抗体は以下より入手した。抗 MET 抗体 (C-28)、抗 ERBB3 抗体 (C-17) および GAPDH (V-18) 抗体は、Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。また Cell Signaling Technology 社 (Beverly, MA, USA) より、AKT (C67E7)、p44/42 MAP kinase (ERK 1/2) (137F5)、そして各リン酸化抗体である抗リン酸化 AKT (Ser473 (587F11))、リン酸化 p44/42 MAP kinase (ERK 1/2) (Thr202/Thr204)、およびリン酸化 MET (pY1234/1235 (D26)) 抗体を購入した。ウサギ・ポリクローナル抗体である抗 CADM1 / TSLC1 抗体 (C-18) を使用したが、この抗体は CADM1 の C 末端の 18 ペプチドをハプテン、keyhole limpet hemocyanin (KLH) を用いて、ウサギに

対して免疫し、抗体は affinity column (MBL 社, Nagoya, Japan) で精製して作製した。蛍光免疫染色の二次抗体として、Alexa Fluoro 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)、Cy3 標識ロバ抗ニワトリ IgG 抗体 (Millipore, Billerica, MA, USA) を使用した。

CADM1 を発現する細胞株の樹立

全長ヒト CADM1 cDNA [38] は、プラスミド pBact-STneoB へ制限酵素 *Sal I* で切断して組み入れ [47]、サブクローニングし pBact-STneoB-CADM1 を得た。トランスフェクションはそれぞれ Lipofectamine LTX (Invitrogen 社, Carlsbad, CA, USA) を推奨条件に従って行ない、500 µg/ml G418 硫酸塩 (Invitrogen 社, Carlsbad, CA, USA) にて選択した独立した恒常的発現株を HCC827GR5 細胞では 2 クローンを得、GR5/CADM1#1、GR5/CADM1#4 と名付けた。また、PC9ZD 細胞では 4 クローンを得、PC9ZD/CADM1#1 細胞、PC9ZD/CADM1#2 細胞、PC9ZDCADM1#3 細胞、PC9ZD/CADM1#5 細胞と名付けた。同様に HCC827GR5 細胞にベクター単独導入細胞を作成し、HCC827GR5V1 細胞、HCC827GR5V2 細胞、HCC827GR5V3 細胞、HCC827GR5V4 細胞、HCC827GR5V5 細胞、HCC827GR5V6 細胞の計 6 クローンを得た。

ウエスタンブロット解析と免疫沈降法

各細胞は、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 150 mM NaCl / 1% Triton X-100 / 1 mM EDTA / 10 mM NaF / 1 mM Na₃VO₄) にプロテアーゼ阻害剤 (200 μM AEBSF, 10 μM leupeptin, 1 μM pepstatin A) と 0.01% βメルカプトエタノール (β-ME) を加えて溶解させ、氷上で 10 分間静置し、15,000 rpm にて 4°C で 10 分間遠心して上清を回収した。上清のタンパク質濃度を 4×SDS loading buffer (0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 40% glycerol, 8% SDS, 20% β-ME, 0.2% bromophenol blue) と純水で 2 mg/ml に調整した後、100°C で 5 分間煮沸し、氷上で 10 分間静置し、各ウエスタン・ブロット用の試料を得た。

また、免疫沈降法においては、Brij98 lysis buffer (1% Brij 98, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM sodium vanadate, 0.02% NaN₃) にプロテアーゼ阻害剤 (200 μM AEBSF, 10 μM, leupeptin, 1 μM pepstatin A) と 0.01% βメルカプトエタノール (β-ME) を加えて溶解させ、免疫沈降に使用する抗 MET 抗体 (C-28)、抗 CADM1 抗体 (C-18)、正常ウサギ IgG 抗体、抗 ERBB3 抗体 (C-17) を各 0.2 μg 加え、4°C で 30 分間反応させた。そして各に protein A Sepharose6MB (GE Healthcare 社, Buckinghamshire, UK) を加えて、4°C で 12 時間反応させたあと、ビーズを上記の Lysis buffer によって 3 回洗浄した。SDS-PAGE ゲル電気泳動は、7.5% acrylamide: bis Separating gel を用い、SDS-PAGE electrodebuffer (25 mM Tris /

0.2 M Glycine / 0.1% SDS) にて定電流 20 mA で約 15 分、続いて定電流 40 mA で約 80 分間行なった。SEMI-DRY 法を用いて、SEMI-DRY transfer buffer (50 mM Tris / 40 mM, Glycine / 20% methanol / 0.1% SDS) に浸した PVDF 膜へ、定電流 110 mA で 60 分間ブロットし、次に 3% スキムミルク / PBST (ブロッキング液) を加えて、室温で 60 分間ブロッキングを行ない、その後、一次抗体を反応させた。一次抗体は、3% スキムミルク / PBST を用いて、1:1,000 の濃度で希釈し、4°C で約 12 時間反応させた。二次抗体は、それぞれの動物種の horse raddish peroxidase (HRP) 標識抗 IgG 抗体を 3% スキムミルク / PBST にて 1:2,000 の濃度に希釈して、室温で 60 分反応させ、PBST で洗浄した。検出は、Pierce® Western Blotting Substrate (Thermo SCIENTIFIC 社) を用いた。現像後の PVDF 膜は、Amide Black にて染色してコントロールとした。

蛍光免疫染色

15 × 15mm カバーガラス入りの 3.6cm ディッシュに HCC827 細胞、HCC827GR5 細胞をそれぞれ一晩 RPMI1640 培地にてインキュベートした。24 時間後、培地を除き、直ちに 4% ホルマリン溶液に 20 分細胞を浸し固定した。1% PBS で 3 回洗浄した後、0.2% Triton X-100 / PBS を 5 分間浸し透過処理を行った。その後、1% PBS で洗浄し、1% Normal goat serum を加え室温で 60 分間ブ

ロッキングを行った。一次抗体は 1% Normal goat serum / PBST を用いて下記濃度に希釈し、室温で約 3 時間反応させた。ニワトリ・モノクローナル抗 CADM1 抗体 (3E1) は 1: 1,000、ウサギ・ポリクローナル抗 MET 抗体 (C-28) は 1: 1,000 とした。PBS で 3 回洗浄し、二次抗体として Cy3 標識ロバ抗ニワトリ抗体および Alexa Fluoro 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体をそれぞれ 1:500 の割合でブロッキング液を用いて希釈し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、カバーガラスを Prolong Gold with DAPI (Invitrogen) で包埋し、蛍光顕微鏡 Axio Observer D1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察した。

ゲフィチニブ感受性試験

GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞、PC9ZD/CADM1#3 細胞、PC9ZD/CADM1#5 細胞を用い、細胞毒性試験を行った。コントロールとして、HCC827 細胞、ベクター単独導入細胞である HCC827GR5V6 細胞、PC9 細胞、PC9ZD 細胞を使用した。CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社、東京、日本) を用い、細胞毒性試験における生細胞数を測定した。MTS テトラゾリウム化合物 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] は細胞によって生物的に還元され、組織培養液に可溶な

発色性のホルマザン産物へと変換される。この変換は、代謝活性がある細胞のデヒドロゲナーゼによって産生される NADPH または NADH によって行われると考えられている。また、このホルマザン産物は 490 nm 可視光をピークに吸収するので、490 nm の可視光の吸光度を調べることで、生細胞の数を定量している。96 ウェルプレートに各細胞を 2.5×10^4 個ずつ撒き、3 ウェルずつ 0 μ M、0.01 μ M、0.1 μ M、1.0 μ M、10 μ M のゲフィチニブを加えた。72 時間インキュベート後、20 μ l の CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent を培養ウェルに直接加え、1 時間インキュベートし、96 ウェルプレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定することで行った。

ゲフィチニブによる 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は以下の式 [48] を利用した。

$IC_{50} = 10^{[\log(A/B) \times (50-C)/(D-C) + \log B]}$ 、A:50% を挟む高い濃度、B:50% を挟む低い濃度、C:B

における阻害率、D:A における阻害率。

PC9 細胞、PC9ZD 細胞、PC9ZD/CADM1#3 細胞、PC9/CADM1#5 細胞の IC_{50} に

対する統計学的解析には Student's t-test を用いた。

結果

ゲフィチニブ感受性細胞 HCC827 より由来したゲフィチニブ耐性細胞 GR5、GR6 において CADM1 の発現は欠如する

Engelman らは HCC827 細胞株にゲフィチニブを約 6 カ月暴露させつづけることで、二つの独立したゲフィチニブ耐性株 HCC827GR5、HCC827GR6 を樹立した。これらの細胞株は *MET* 遺伝子増幅により過剰発現した *MET* が *EGFR* に非依存的に *ERBB3* を活性化させ、がん細胞の生存、増殖を促進することで、耐性を獲得していた [24]。

HCC827 細胞株と、*MET* 過剰発現によりゲフィチニブに耐性を示した HCC827GR5 細胞の *CADM1* と *MET* の発現量についてウエスタンブロット法と蛍光免疫染色を用いて解析した (図 15、図 16)。ウエスタンブロット法の結果、HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞の *MET* 発現は親細胞株の HCC827 細胞と比較し、そのシグナル強度は高く過剰発現していた。また、*MET* リン酸化の程度も、耐性株である HCC827GR5 細胞と HCC827GR6 細胞は親細胞である HCC827 細胞と比べ増強していた。一方で、HCC827 細胞では *CADM1* の発現が認められたが、HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞では *CADM1* の発現は消失、もしくは減弱していた。さらに、蛍光免疫染色法においては、HCC827 細胞上では、細胞膜上に *MET* と *CADM1* の発現を認め、一部で共局在していた。以上よ

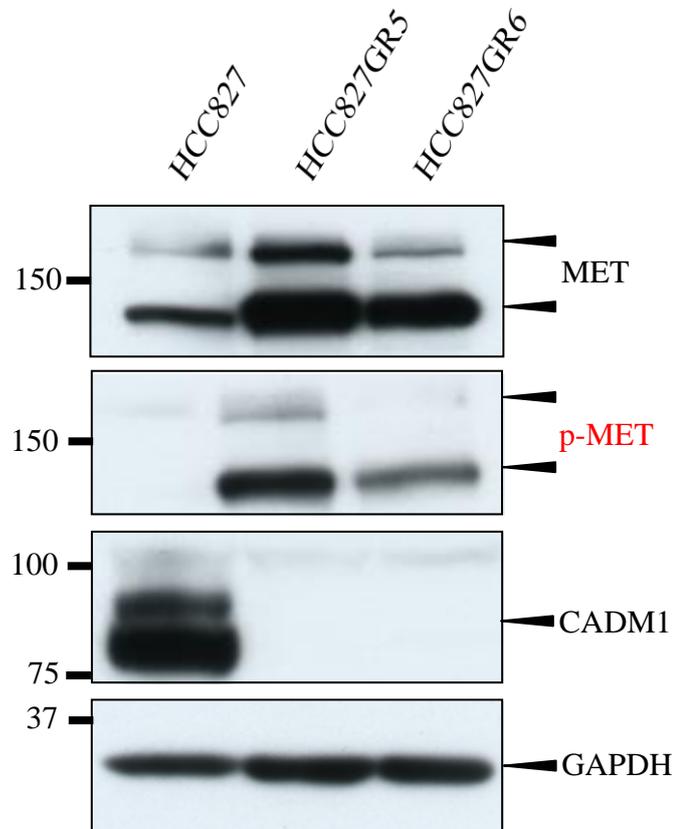


図 15. HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞における MET の活性化と CADM1 の発現欠如

MET、p-MET、CADM1 のウエスタンブロット解析。これまでの報告通り MET は HCC827 細胞と比較し、HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞で過剰発現していた。さらに、MET リン酸化シグナルは HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞で HCC827 細胞と比較し増強していた。一方で、HCC827 細胞で検出された CADM1 は、HCC827GR5 細胞と HCC827GR6 細胞では検出されなかった。

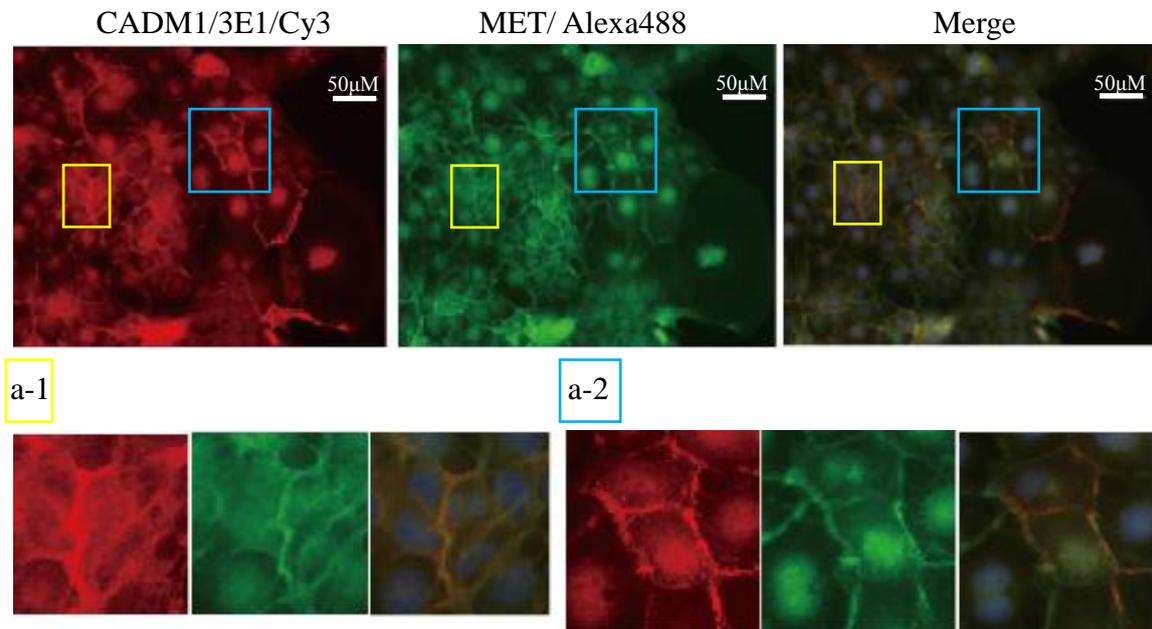


図 16. HCC827 細胞における CADM1 と MET の細胞膜上の共局在
HCC827 細胞における CADM1 (赤) と MET (緑) の蛍光二重染色像 (対物×10)。
CADM1 と MET は細胞膜上で共局在している。
a-1) (A)の黄枠内を拡大した画像。 a-2) (A)の青枠内を拡大した画像。 CADM1
と MET のシグナルが重複して観察される。

り、MET 過剰発現によるゲフィチニブへの耐性獲得と、CADM1 の発現は逆相関していることが示された。

HGF を強制発現させた HCC827 細胞において CADM1 の発現は著明に低下する

HCC827-HGF1 細胞、HCC827-HGF2 細胞は、高濃度の HGF を自家産生し、MET を恒常的にリン酸化することで、MET 下流経路のシグナルを伝達している。その結果、EGFR 非依存的に細胞の生存、増殖を促し、ゲフィチニブに対する IC₅₀ が 10 μM 以上と HCC827GR5 細胞、HCC827GR6 細胞と比較しても遜色のない強い耐性を獲得していた [46]。これらの細胞株を用いて、MET のリン酸化シグナルと CADM1 の発現の関係をウェスタンブロット法にて解析した (図 17)。その結果、親株である HCC827 細胞と比較し強い MET リン酸化シグナルと、CADM1 の発現減少を認めた。また、HCC827 細胞にベクターを単独導入した HCC827GR5V6 細胞と比較し、HCC827-HGF1 細胞と HCC827-HGF2 細胞の MET リン酸化シグナルは弱く、かつ CADM1 の発現減少の割合は小さいことが示された。以上より、HGF 恒常性発現株において、CADM1 発現が低下することが示された。

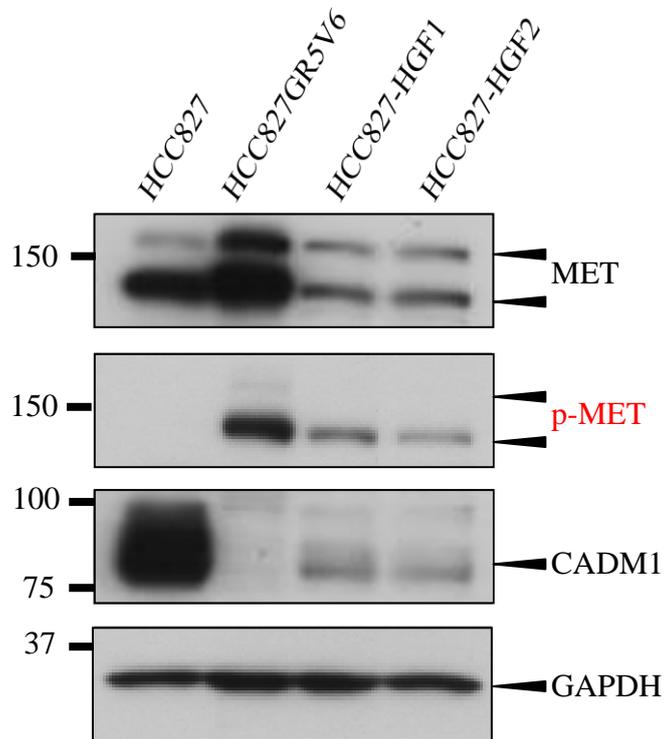


図 17. HCC827 細胞、HCC827GR5V6 細胞、HCC827-HGF1 細胞、HCC827-HGF2 細胞における MET の発現、リン酸化と CADM1 の発現
HCC827-HGF 細胞は HCC827 細胞と比べ、その MET のリン酸化は増強している。一方で、CADM1 の発現は低下しており、MET のリン酸化と CADM1 の発現は逆相関している。

HCC827GR5 細胞への CADM1 導入によりゲフィチニブ感受性は回復する

HCC827GR5 細胞に CADM1 の発現ベクターを導入し、2 つの独立した CADM1 恒常発現株、GR5/CADM1#1 細胞と GR5/CADM1#4 細胞を樹立した (図 18)。

HCC827 細胞と比較して、CADM1 の発現量は GR5/CADM1#1 細胞では増強、GR5/CADM1#4 細胞では低下していた。

次に、CADM1 を導入した GR5 細胞株がゲフィチニブへの感受性を回復するか否かを調べるため、HCC827 細胞、HCC827GR5V6 細胞、GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞を用い MTS アッセイを施行した (図 19)。その結果、HCC827 細胞はゲフィチニブ濃度依存的に細胞生存率を低下させ、ゲフィチニブ感受性を認めた。また、HCC827GR5V6 細胞は耐性を認めた。一方で、GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞はゲフィチニブ濃度依存的に細胞生存率を低下させており、ゲフィチニブ感受性の回復を認めた。50% 阻害率 (50% inhibitory concentration : IC₅₀) は HCC827 細胞において $0.023 \pm 0.023 \mu\text{M}$ 、HCC827GR5V6 細胞においては $10 \mu\text{M}$ 以上と、他の文献の結果と同様であった [24,49]。また、GR5/CADM1#1 細胞は $0.93 \pm 0.94 \mu\text{M}$ 、GR5/CADM1#4 細胞は $0.50 \pm 0.72 \mu\text{M}$ であり、HCC827 細胞と比較して各々 40 倍、22 倍の値を示し、感受性の回復を認めた。しかし、親細胞 HCC827 の感受性には至らなかった (表 8)。以上より、

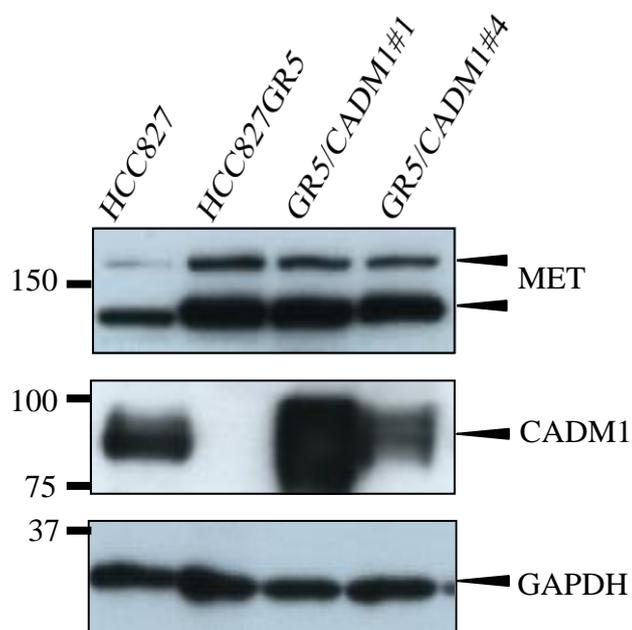


図 18. CADM1 発現細胞株 GR5/CADM1#1、GR5/CADM1#4 の樹立
HCC827GR5 細胞に CADM1 の cDNA をトランスフェクションし、G418
で選択した後に、恒常的に CADM1 を発現する 2 つの独立した細胞株であ
る GR5/CADM1#1 細胞株、GR5/CADM1#4 細胞株を樹立した。

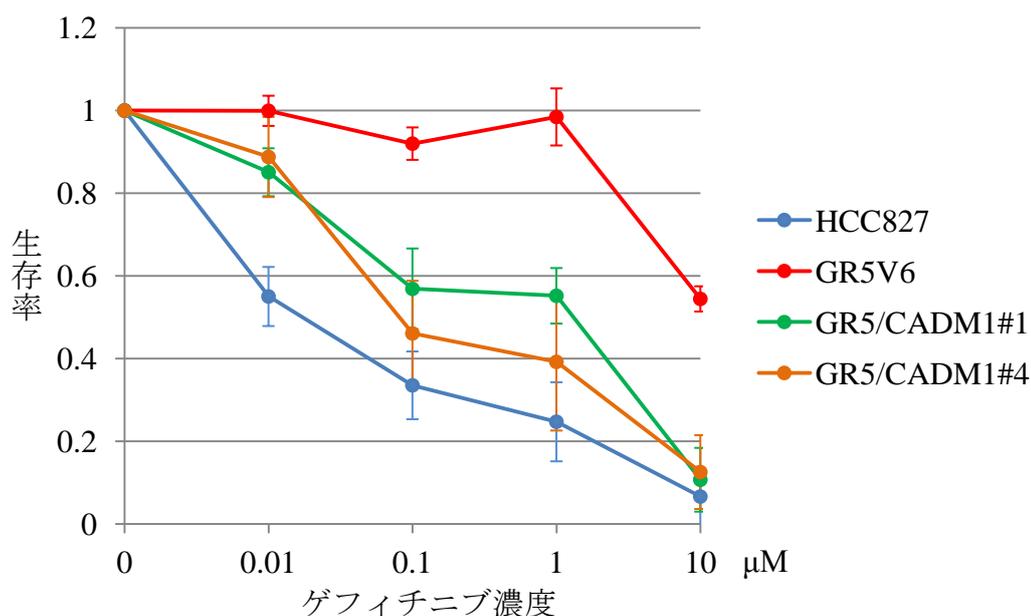


図 19. HCC827 細胞、GR5 細胞並びに GR5 細胞への CADM1 強制発現細胞株におけるゲフィチニブ感受性試験

MTS アッセイを用いて、ゲフィチニブ感受性試験を行った。HCC827 細胞はゲフィチニブに感受性を認め、ベクター単独導入 GR5V6 細胞はゲフィチニブに耐性を認めた。CADM1 強制発現株である、GR5/CADM1#1 細胞と GR5/CADM1#4 細胞は、ベクター単独導入 GR5V6 細胞に比べ、ゲフィチニブ感受性の回復を認めた。なお、生体におけるゲフィチニブ 225 mg/body 投与時の最高血中濃度 (Cmax) は約 0.7 μM [50] で、また、ゲフィチニブ 250 mg/body 投与時の血中トランプ値は約 0.4 μM [15] と言われている。

表 8： HCC827 細胞並びにその由来細胞のゲフィチニブに対する 50%阻害率
GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞では GR5V6 細胞と比べ、明らかにゲ
フィチニブ感受性を回復している。

	IC ₅₀ 値
HCC827	0.023 ± 0.023 μM
GR5V6	>10 μM
GR5/CADM1#1	0.93 ± 0.94 μM
GR5/CADM1#4	0.50 ± 0.72 μM

ゲフィチニブ耐性株 HCC827GR5 に CADM1 を導入することにより、ゲフィチニブ感受性が回復することが示された。

CADM1 と MET は複合体を形成する

次に、CADM1 と MET が複合体を形成しているか否かを調べるために、免疫沈降法を施行した (図 20)。GR5/CADM1#1 細胞の抽出液を抗 MET 抗体で免疫沈降させ、抗 CADM1 抗体で検出したところ、CADM1 と MET の共沈を認めた。

また、抗 CADM1 抗体で免疫沈降させ、抗 MET 抗体で検出したところ、CADM1 と MET の共沈を認めた。以上より、GR5/CADM1#1 細胞では、MET と CADM1 が複合体を形成していることが示された。

さらに、CADM1 と ERBB3 が複合体を形成しているか否かを調べるために、同様に免疫沈降法を用い検討を行った (図 21)。GR5/CADM1#1 細胞の抽出液を抗 ERBB3 抗体で免疫沈降させ、抗 CADM1 抗体で検出したところ、CADM1 と ERBB3 の共沈は認めなかった。また、抗 CADM1 抗体で免疫沈降させ、抗 ERBB3 抗体で検出したが、CADM1 と ERBB3 の共沈は認められなかった。以上より、GR5/CADM1#1 細胞で CADM1 と ERBB3 は複合体を形成しないことが示唆された。

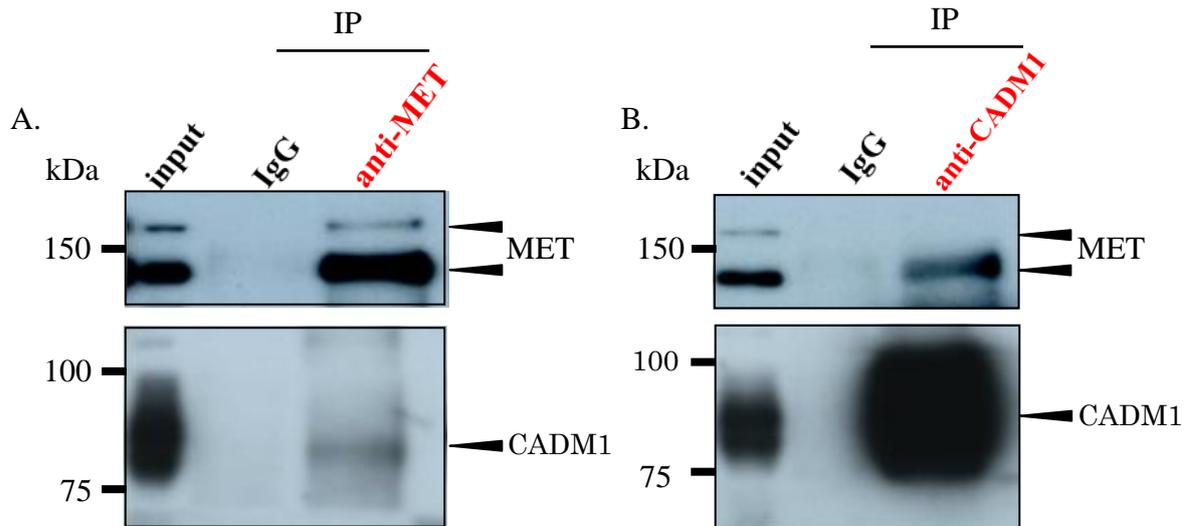


図 20. GR5/CADM1#1 細胞における CADM1 と MET との免疫沈降とウェスタンブロット解析

GR5/CADM1#1 細胞を用いた CADM1 と MET の相互作用の有無の検出をした。

(A) GR5/CADM1#1 細胞の抽出物を抗 MET 抗体にて免疫沈降し、抗 CADM1 抗体によるウェスタンブロットを行ったところ、CADM1 に対応するバンドが検出された。

(B) GR5/CADM1#1 細胞の抽出物を抗 CADM1 抗体にて免疫沈降し、抗 MET 抗体によるウェスタンブロットを行ったところ、MET に対応するバンドが検出された。

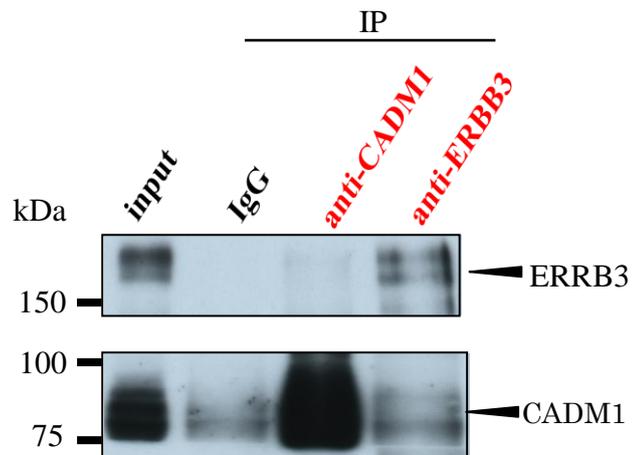


図 21. GR5/CADM1#1 細胞における CADM1 と ERBB3 との免疫沈降とウエスタンブロット解析

GR5/CADM1 細胞を用いて CADM1 と ERBB3 の相互作用の有無を検出した。GR5/CADM1#1 細胞の抽出物を抗 CADM1 抗体で免疫沈降し、抗 ERBB3 抗体によるウエスタンブロット解析を行ったところ、ERBB3 に対応するバンドは検出されなかった。

一方、抗 ERBB3 抗体にて免疫沈降し、抗 CADM1 抗体でウエスタンブロット解析を行ったところ、CADM1 に対応するバンドは検出されなかった。

ゲフィチニブを投与された GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞において、MET とその下流分子群の活性は抑制される

HCC827GR5V6 細胞、GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞に対し、5 μ M のゲフィチニブを添加した各細胞と、無添加の各細胞を 48 時間培養し MET およびその下流経路分子のリン酸化を、ウエスタン・ブロット法にて検出、得られたバンドを定量しゲフィチニブ非暴露群と、暴露群で比較した (図 22)。その結果、ゲフィチニブ存在下において GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞では、MET およびその下流の AKT、ERK1/2 のリン酸化が、HCC827GR5V6 細胞と比較して減少していることが示された。また、細胞死の指標となる切断型 PARP のシグナル強度も GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞では HCC827GR5V6 細胞と比較して増加した。このことから、ゲフィチニブによりアポトーシスが誘導されていることが示唆された。一方で、ゲフィチニブ非存在下においては、GR5/CADM1#1 細胞と GR5/CADM1#4 細胞の MET のリン酸化強度は HCC827GR5V6 細胞と比べ変化は認めなかった。

また、これらのシグナル強度を Image J ソフトウェア (アメリカ国立衛生研究所, Bethesda, Maryland, USA) を用いて定量し、CADM1 導入の有無における各分子のリン酸化、ならびに PARP の切断を定量的に比較した (図 23)。その結果 CADM1 導入細胞である GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞において、

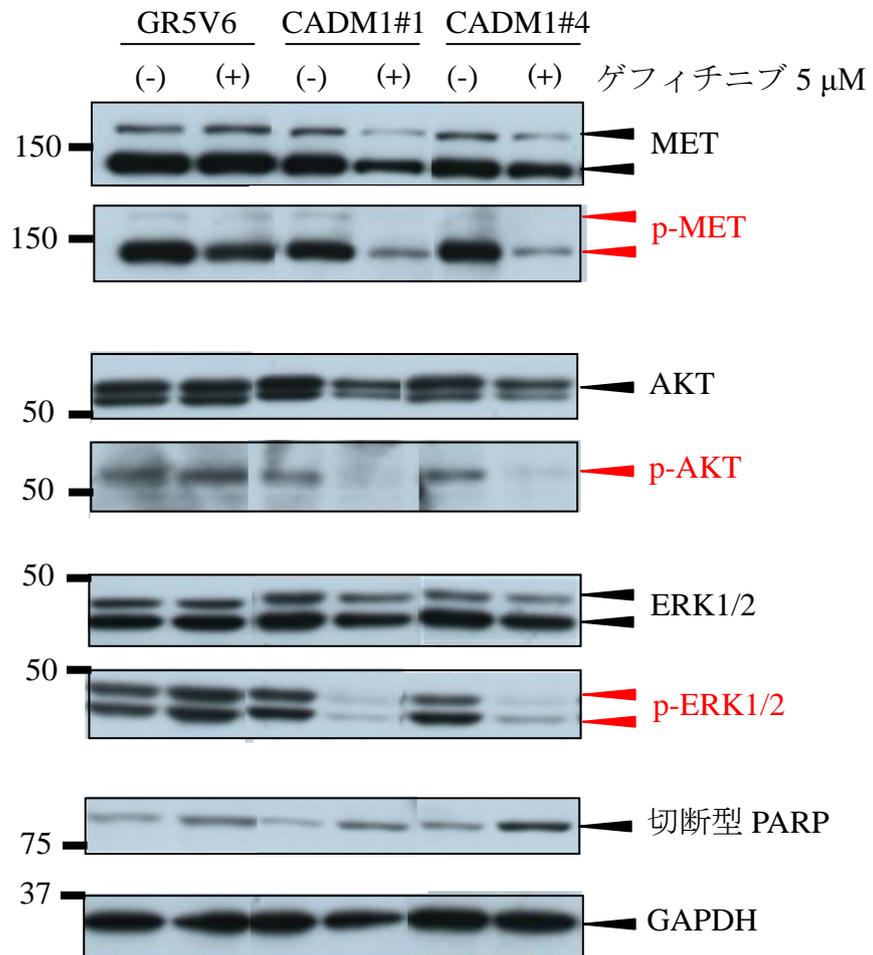


図 22. MET およびその下流経路のリン酸化活性、ならびに PARP の切断 GR5/CADM1 細胞とベクター単独導入した GR5V6 細胞に対し、5 μ M のゲフィチニブを添加 (+)、無添加 (-) で 48 時間培養し、MET および AKT、ERK1/2 のリン酸化を、ウエスタン・ブロット解析にて検出した。GR5/CADM1 細胞では、リン酸化 MET およびその下流分子群のリン酸化の活性が、ベクター単独導入 GR5 細胞よりゲフィチニブ存在下では抑制された。また、切断型 PARP のシグナル強度も CADM1 導入細胞では高く、ゲフィチニブによりアポトーシスの誘導が示唆された。

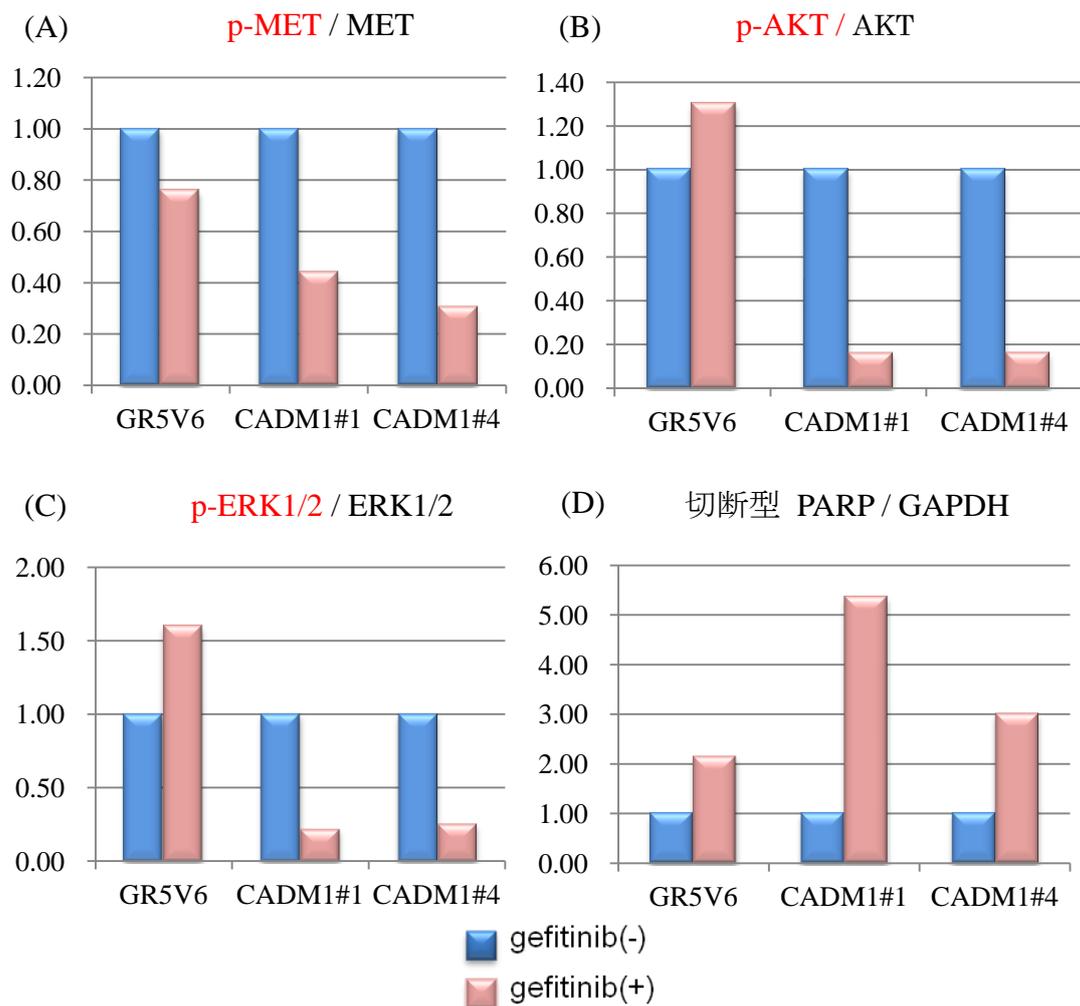


図 23. CADM1 による MET およびその AKT、ERK1/2 のリン酸化、ならびに PARP の切断 (図 22 の定量化)

図 22 のウェスタンブロット解析の結果を Image J ソフトを用いて定量し、CADM1 導入前後における各分子のリン酸化、ならびに PARP の切断を定量的に比較した。CADM1 導入細胞である GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞において、MET (A)、AKT (B)、ERK1/2 (C) のリン酸化活性は、ゲフィチニブ暴露前と比較して暴露後は減弱していた。また、切断型 PARP の発現 (D) は CADM1 導入後、上昇した。

一方、ベクター単独導入した GR5V6 細胞では、MET (A) のリン酸化活性は、ゲフィチニブ暴露前と比較して暴露後は減弱したが、その程度は CADM1 導入細胞と比べ小さかった。また、AKT (B)、ERK1/2 (C) のリン酸化活性は上昇した。切断型 PARP の発現 (D) はゲフィチニブ暴露後上昇したが、CADM1 導入細胞にくらべ、その程度は低いことが示された。

MET、AKT、ERK1/2 のリン酸化は、ゲフィチニブ非暴露群と比較して暴露群はそれぞれ 50% 以下、20% 以下、50%以下に減弱していた。また、切断型 PARP の発現は CADM1 導入後、ゲフィチニブ非暴露群と比較して暴露群は各々約 2.5 倍、1.5 倍に上昇していた。一方、ベクター単独導入した HCC827GR5V6 細胞では、MET のリン酸化は、ゲフィチニブ非暴露群と比較して暴露群は減弱したが、その程度は CADM1 導入細胞と比べ小さかった。また、AKT、ERK1/2 のリン酸化はゲフィチニブ非暴露群と比較して上昇していた。切断型 PARP の発現はゲフィチニブ暴露群で上昇したが、CADM1 導入細胞と比較して、その程度は小さかった。

以上より、*MET* 遺伝子増幅により MET が過剰発現し、恒常的なリン酸化を惹起することによりゲフィチニブに対し耐性を獲得した HCC827GR5 細胞において、CADM1 はゲフィチニブ存在下で MET とその下流分子のリン酸化を抑制し、ゲフィチニブ耐性細胞の生存を抑制する効果が示された。

***EGFR* の T790M 変異を有するゲフィチニブ耐性細胞株においては CADM1 導入によるゲフィチニブ感受性回復は認めない**

肺腺がんにおけるゲフィチニブ耐性機序のうち約 50% は、EGFR 遺伝子のコドン 790 のスレオニンがメチオニンに変化する (T790M) ことで、耐性を獲得す

ると言われている [22]。そこで、T790M により耐性を獲得した肺腺がんにおいて、CADM1 がゲフィチニブ感受性を回復しうるか否かを調べた。

ヒト肺腺がん細胞株 PC9 細胞は、EGFR 遺伝子のエクソン 19 (E746-A750) に欠失変異を持ち、EGFR-TKIs に高い感受性を示す。一方で、PC9ZD 細胞は EGFR 遺伝子のコドン 790 のスレオニンがメチオニンに変化する (T790M) ことで、EGFR-TKIs に耐性を獲得している。まず、PC9 細胞と PC9ZD 細胞の MET と CADM1 の発現をウエスタンブロット法を用いて解析した。その結果 PC9 細胞と PC9ZD 細胞の MET の発現は変わらず、また、CADM1 の発現は両者とも検出できなかった (図 24)。

そこで、PC9ZD 細胞に CADM1 を導入し、CADM1 を恒常的に発現した 4 クローンを樹立した (図 24)。このうち、PC9ZD/CADM1#3 細胞、PC9ZD/CADM1#5 細胞を実験に使用した。CADM1 を導入した PC9ZD 細胞株がゲフィチニブへの感受性を回復するか否かを調べるため、PC9 細胞、PC9ZD 細胞、PC9ZD/CADM1#3 細胞、PC9ZD/CADM1#5 細胞を用い MTS アッセイを施行した (図 25)。その結果、PC9 細胞はゲフィチニブ濃度依存的に細胞活性を低下させ、ゲフィチニブ感受性を認めた。また、PC9ZD 細胞は耐性を認めた。一方で、PC9ZD/CADM1#3 細胞、PC9ZD/CADM1#5 細胞は、ゲフィチニブ感受性の回復を認めなかった。

50%阻害率 (50% inhibitory concentration : IC₅₀) は PC9 細胞において 0.062±0.028

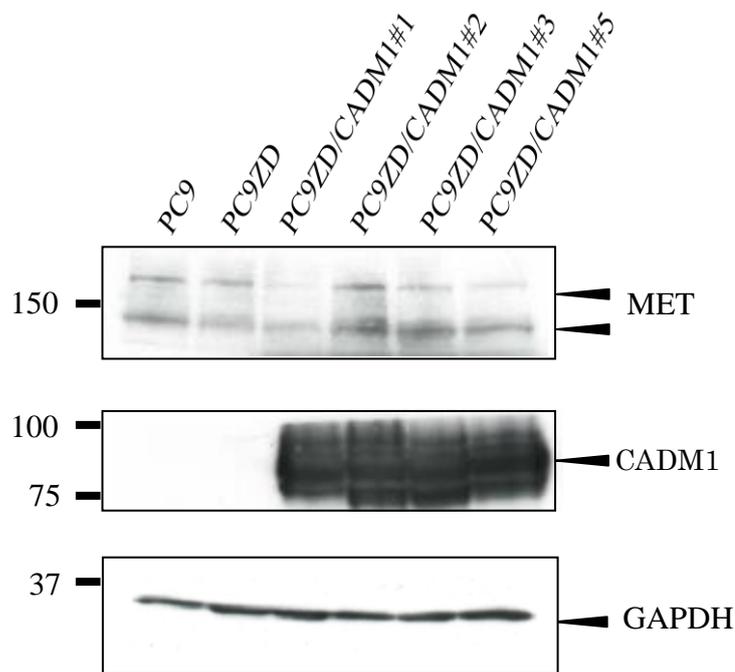


図 24. CADM1 発現細胞株 PC9ZD/CADM1#1、PC9ZD/CADM1#2、PC9ZD/CADM1#3、PC9ZD/CADM1#5 の樹立と、PC9 細胞、PC9ZD 細胞、PC9ZD/CADM1#1 細胞、PC9ZD/CADM1#2 細胞、PC9ZD/CADM1#3 細胞、PC9ZD/CADM1#5 細胞における MET と CADM1 の発現

PC9 細胞と PC9ZD 細胞との MET の発現は変化なく、CADM1 の発現は両者で欠如していた。PC9ZD 細胞に CADM1 の cDNA をトランスフェクションし、G418 で選択した後に、恒常的に CADM1 を発現する 4 つの独立した細胞株である PC9ZD/CADM1#1 細胞、PC9ZD/CADM1#2 細胞、PC9ZD/CADM1#3 細胞、PC9ZD/CADM1#5 細胞を得た。PC9ZD 細胞と CADM1 を導入した 4 つの細胞株を比較すると、MET と CADM1 の発現量とは同等であった。

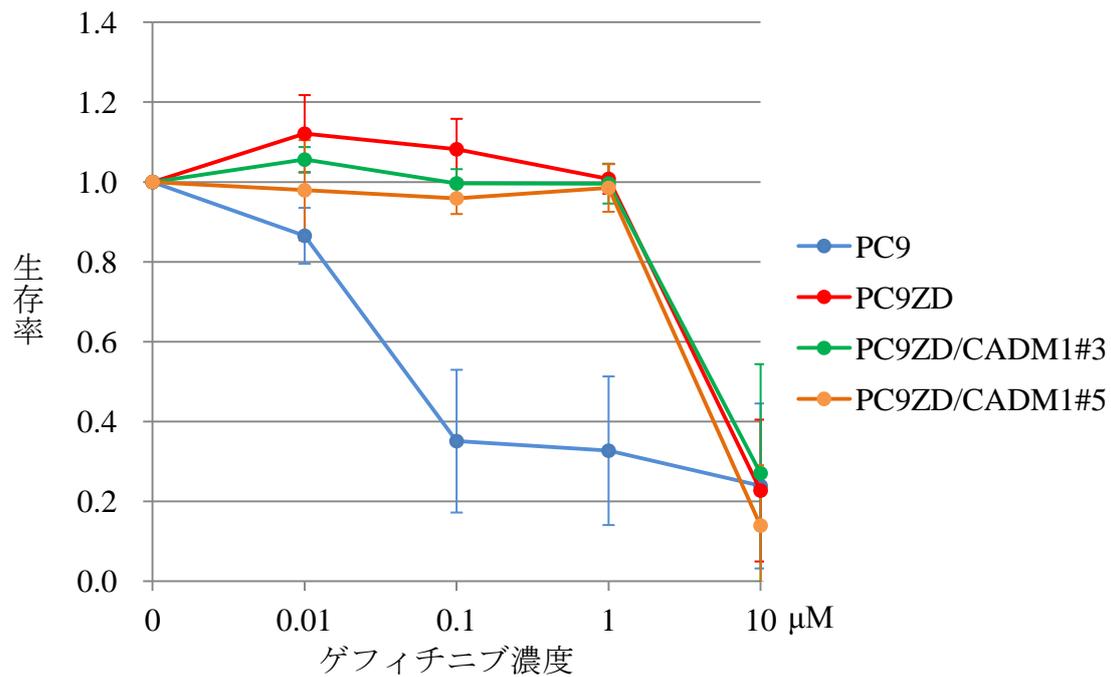


図 25. PC9 細胞、PC9ZD 細胞並びに PC9ZD 細胞への CADM1 強制発現細胞株におけるゲフィチニブ感受性試験

MTS アッセイを用いて、ゲフィチニブ感受性試験を行った。PC9 はゲフィチニブに感受性を認め、また、PC9ZD 細胞はゲフィチニブに耐性を認めた。CADM1 強制発現株である、PC9ZD/CADM1#3 細胞と PC9ZD/CADM1#5 細胞とは、ゲフィチニブ感受性の回復を認めなかった。

表 9： PC9 細胞並びにその由来細胞のゲフィチニブに対する 50%阻害率
 PC9ZD/CADM1#3 細胞、PC9ZD/CADM1#5 細胞では PC9 細胞、PC9ZD 細胞と比較して、ゲフィチニブの感受性の回復は認めなかった。

	IC ₅₀ 値	
PC9	0.062 ± 0.028 μM	
PC9ZD	4.2 ± 1.4 μM]n.s.]n.s.
PC9ZD/CADM1#3	6.8 ± 5.1 μM	
PC9ZD/CADM1#5	3.9 ± 0.79 μM	

μM 、PC9ZD 細胞においては $4.2 \pm 1.4 \mu\text{M}$ であった。これらの値は他の文献の結果と同様であった [45]。一方で、PC9ZD/CADM1#1 細胞は $6.8 \pm 5.1 \mu\text{M}$ 、PC9ZD/CADM1#4 細胞は $3.9 \pm 0.79 \mu\text{M}$ であり、感受性の回復を全く認めなかった (表 9)。

考察

肺腺がんに対するゲフィチニブやエルロチニブを始めとした EGFR-TKIs による分子標的治療の奏功例の多くは、1-2 年以内に耐性を獲得することが大きな問題となっている。近年、耐性獲得の分子機序が明らかになるにつれ、対応する耐性を克服するための治療法が研究されている。肺腺がんにおけるゲフィチニブ耐性機序としては、その約 50% が *EGFR* 遺伝子の T790M 変異により耐性を獲得し、また、5-22% は *MET* 遺伝子増幅により耐性を獲得する [22,24]。さらに、小細胞肺がんへの形質転換や、HGF の過剰分泌により MET が恒常的に刺激されることで、ゲフィチニブ存在下においても、がん細胞の生存を促進し耐性を獲得するという報告もみられる [22,51]。耐性を獲得した肺腺がんに対しては、様々な治療が開発されつつある。2011 年の American Society of Clinical Oncology (ASCO) において、Janjigian らは T790M 変異を持つ肺腺がんに対しては非可逆性 EGFR-TKI である afatinib と抗 EGFR モノクローナル抗体である cetuximab の併用療法で、T790M が確認された症例の 29% に部分寛解を認めたと報告し [52]、現在も治験が進行中である。また、MET や HGF に対しては Tivantinib (ARQ 197) や Crizotinib (PF-2341066) などの MET 阻害薬、抗 HGF 抗体である Ficlatusumab (AV-299) などが開発されており [53]、これらの薬剤が MET 過剰発現や、HGF 過剰分泌によって EGFR-TKI に対し耐性を獲得した肺腺がんの克服にも期待できると考えられる。このように、肺腺がんの EGFR-TKIs 耐性獲得症例において、

その耐性獲得機序を知ることは、その後の治療方針を決定する上で必須であるため、EGFR-TKIs 耐性獲得時に組織生検や細胞診から再度免疫組織染色や遺伝子検査を行い、耐性獲得機序に応じた治療を選択することが重要である。さらに、耐性獲得前の組織検体などから、耐性獲得機序の予測を可能とする分子マーカーの発見は、耐性獲得時に生検等の検査が不必要になるだけでなく、予測される耐性獲得機序に対応した治療の介入を耐性獲得前から可能とし、治療法選択の上で大きな福音となると考えられる。

本研究では、CADM1 の発現の欠如により MET は活性化すること、また、CADM1 が MET とその下流経路とを抑制する [43] ことに基づき、ヒト肺腺がん HCC827 細胞由来で、*MET* 遺伝子増幅によるゲフィチニブ耐性を獲得した細胞で、CADM1 の発現状態の検討を行い、さらに、CADM1 を耐性細胞に外来性に発現させることにより、ゲフィチニブ耐性克服の治療に応用できるか否かを検討した。

今回の解析で用いた 2 つの独立して得られたゲフィチニブ耐性細胞である HCC827GR5 細胞と HCC827GR6 細胞は *MET* 遺伝子が増幅し、MET が過剰に発現することで MET リン酸化が亢進し、ERBB3 を介して EGFR に非依存的にその下流経路のシグナルを活性化させ、ゲフィチニブに対する耐性を獲得していると考えられている [24]。この耐性獲得に伴い、HCC827GR5 細胞、HCC827GR6

細胞において、MET は共に活性化し、かつ *CADM1* の発現が共に欠如していることは、MET 活性化による耐性獲得機序に *CADM1* が関与していることを示唆していると考えた。

永田らの報告 [43] より、*CADM1* は MET の活性を抑制することから、耐性獲得の過程で *CADM1* 遺伝子のメチル化による不活化を生じた一部の細胞において、MET の活性が増強され、その結果、増殖に有利となり、この形質が細胞集団の中で選択、固定されたと推測された。従って、*CADM1* の発現欠如も *MET* 遺伝子の増幅も共に、MET の活性化をもたらし、互いに MET 活性を増強すると考えられた。*CADM1* 遺伝子は肺がんを含む多くのがんでそのプロモーター領域のメチル化によって不活化され、発現が欠如することが確かめられている [38,54-63]。また、マイクロ RNA である miR-214 と miR-375 の発現がヒト非小細胞肺がんにおいて *CADM1* の発現を抑制し、*CADM1* の発現を負に制御していることが知られている [64]。今回の結果で、HCC827 細胞がゲフィチニブ耐性を獲得する過程において *CADM1* の発現が欠如した機序として、遺伝子メチル化や、mir-214、mir-375 の過剰発現が関わっている可能性が考えられた。

一方で、HGF により恒常的に MET が活性化されている HCC827-HGF1 細胞、HCC827-HGF2 細胞において、MET のリン酸化活性は HCC827 細胞と比較して高い一方で、*CADM1* の発現は HCC827 細胞に比較して減少していた (図 17)。

ここでも、HGFによりMETが恒常的に活性化されることに加えて、MET経路を抑制するCADM1の発現がメチル化等により低下し、METの活性が増強していると考えられた。一方、HGF-METタンパク質の細胞内へのインターナリゼーションにより、膜たんぱく質であるCADM1も同時にインターナリゼーションすることにより、CADM1タンパク質の量が低下している可能性も考えられた。

次に、CADM1がMETとその下流経路を抑制するという実験結果から [43]、HCC827GR5細胞にCADM1を外来性に導入することにより、METならびに、その下流経路が抑制されるのではないかと考え実験を進めた。MET過剰発現により耐性を獲得した細胞にCADM1を導入すると、ゲフィチニブ感受性を回復し、ゲフィチニブ存在下ではMETやAKT、ERK1/2のリン酸化が抑制された。さらに、CADM1導入細胞をゲフィチニブに暴露させると、耐性細胞と比較し、切断型PARPの発現が上昇し、アポトーシスが誘導されていることが確かめられた (図 22、図 23)。

ただし、ここでゲフィチニブ非存在下では、CADM1の発現がMET活性化を抑制しなかったことは注意を要する。Guoらによると、エクソン19の欠失変異や、L858Rなどの遺伝子変異により活性化されたEGFRはMETを活性化させており、ゲフィチニブによりEGFRの活性が阻害されると、MET活性も抑制される。さらに、METが過剰発現した細胞ではMETはEGFRを活性化させており、

MET 阻害薬により MET 活性が阻害されると、EGFR 活性も抑制される、と報告している [65]。従って、MET が過剰発現し、かつ EGFR 遺伝子変異のある肺腺がん細胞は、MET と EGFR 間のシグナルが両方向に存在すると考えられた (図 26A)。また、ゲフィチニブ存在下においては EGFR の活性は抑制されるため、EGFR から MET へのシグナルは減弱するが、過剰発現した MET から ERBB3 を介して、EGFR 下流経路にシグナルが伝わるためゲフィチニブ耐性を獲得すると考えられた (図 26B)。本実験において、MET 過剰発現により耐性を獲得した細胞に CADM1 を導入したところ、ゲフィチニブ非存在下においては MET のリン酸化の強度は CADM1 非導入耐性細胞と比較して変化を認めず、細胞も生存した。これは、ゲフィチニブ非存在下においては、CADM1 は MET から EGFR 経路へのシグナルを抑制するものの EGFR 自体が活性化しているため、MET および ERBB3 を活性化させ、その結果、ERBB3 からの細胞生存シグナルにより細胞が生存していると考えられた (図 26C)。一方、ゲフィチニブ存在下においては、CADM1 が MET 経路を抑制するとともに、ゲフィチニブにより EGFR の活性が阻害されることにより、EGFR から MET へのシグナルも減弱し、MET のリン酸化が抑制されることが考えられた (図 26D)。つまり、CADM1 とゲフィチニブの相加、又は相乗効果により、EGFR 活性と MET 活性が同時に抑制され、両者間のクロストークが減弱することにより、細胞生存シグナルの抑制を来し、細

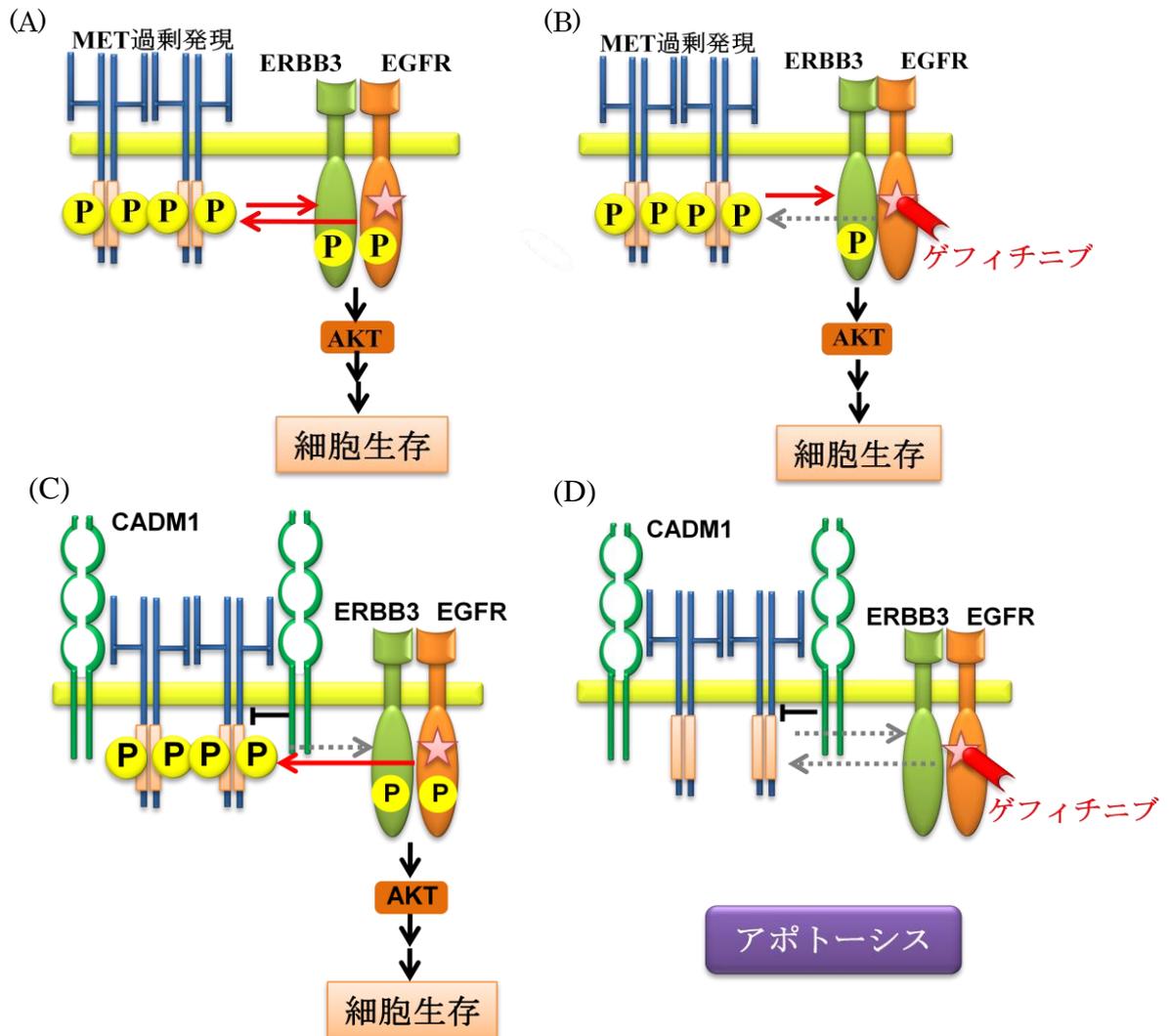


図26. MET過剰発現によりゲフィチニブ耐性を獲得した *EGFR*変異細胞における MET、ERBB3、EGFR のクロストークと推測される CADM1 の関係
 (A) 過剰発現した MET から ERBB3 へシグナルが伝わる一方、EGFR から MET へのシグナルが伝達されている。
 (B) ゲフィチニブの投与により、EGFR 活性が阻害され、かつ MET へのシグナルが抑制されるが、MET からのシグナルが ERBB3 を介し伝達され、下流分子が活性化される。
 (C) CADM1 は EGFR から MET へのシグナルは抑制しないため、CADM1 による MET の抑制に関わらず MET の活性は維持される。一方で、細胞生存のためのシグナルは EGFR から ERBB3 より伝達され、下流分子を活性化している。
 (D) ゲフィチニブ存在下では EGFR の活性が抑制され、かつ CADM1 により MET が抑制されることで、MET から ERBB3 へのシグナルが抑制されるため、MET 及び EGFR 下流分子の活性が抑制され、アポトーシスが誘導される。

胞の生存率の低下を認めたと考えられた。以上述べた CADM1 と MET、EGFR や ERBB3 との関係については未だ十分に解明できておらず、今後 CADM1 がこれらの分子とどのような分子構造で関わっているかを解析する必要がある。

ヒトの生体内において、ゲフィチニブ 225 mg / body 投与時の最高血中濃度 (Cmax) は約 0.7 μ M で [50]、また、ゲフィチニブ 250 mg / body 投与時の血中トラフ値は約 0.4 μ M と考えられている [15]。今回の結果では、これらのトラフ値や最高血中濃度は IC₅₀ の値と比較して十分高い値とは言えないことから、MET 過剰発現により耐性を獲得した肺腺がんに対し、CADM1 の導入により、*in vitro* と同様にヒトの生体内でゲフィチニブの感受性の回復につながるか否かについては今後の検討が必要である。今回の *in vitro* の実験では、実際に生体内における薬物動態や腫瘍の生育環境は反映されていない。今後は、*in vitro* で判明した薬力学データを基盤とした Therapeutic Drug Monitoring (TDM) を、*in vivo* の実験で具体化する必要がある。そこで、マウスを用いて GR5/CADM1#1 細胞、GR5/CADM1#4 細胞に対するゲフィチニブの抗腫瘍効果の検証が必要と思われる。

一方で、MET に依存せず T790M 変異によりゲフィチニブに耐性を示す PC9ZD に CADM1 を導入したところ、ゲフィチニブ感受性は回復しないことが示された (図 25、表 9)。以上の実験結果から、CADM1 はこの T790M 変異 EGFR を阻

害する活性は持たないことが示された。

次に、CADM1 による MET 活性化抑制の分子機序について考察する。CADM1 の細胞内ドメインには 4.1 結合モチーフや PDZ 結合モチーフが存在し、この部位を介してそれぞれ 4.1 タンパク質群や膜結合性グアニレートキナーゼ (MAGuKs) 分子群と結合している。Mao らにより、4.1 結合モチーフ、PDZ 結合モチーフ、あるいは細胞内ドメイン全体を欠失させた CADM1 変異体は、A549 細胞のマウスにおける腫瘍原性抑制活性を失うことが明らかにされている [66]。このことより、4.1 タンパク、MAGuKs 分子、CADM1 からなる細胞内の分子経路全体が腫瘍抑制に必須であると考えられており、MET に対する抑制機構においてもこの部位全体が関わっている可能性が考えられた。

Kawano らは、CADM1 と ERBB3 を外来性に強制発現させた A549 細胞においては、CADM1 と ERBB3 は細胞外ドメインで結合し、さらに CADM1 の PDZ 結合モチーフに結合し活性化された脱リン酸化酵素 PTPN13 は、リガンド刺激に対する ERBB3 のリン酸化およびその下流の AKT や Rac の活性を抑制することを明らかにした [67]。この報告から、MET は CADM1 と細胞外ドメインで結合し、さらに、CADM1 の PDZ 結合モチーフに PTPN13 等の脱リン酸化酵素が結合し、MET の活性を抑制している可能性は十分に考えられた。今後、細胞内ドメイン、細胞外ドメインを欠失させた CADM1 変異体を HCC827GR5 細胞、

HCC827GR6 細胞に導入し、CADM1 のどの部位がゲフィチニブ感受性を回復する上で必須であるか、また、どの部位で MET と CADM1 は複合体を形成しているかを明らかにすることが、CADM1 による MET 抑制機構の解明に必要であると考えられた。

ここで、今後の肺腺がんの診断、治療に対する CADM1 の期待される役割について考察する。今回解析に用いた HCC827 細胞からは、GR5 細胞や GR6 細胞以外にも、複数の研究室で EGFR-TKIs 耐性細胞が樹立されたが、いずれも MET の過剰発現によるものであった [68,69,70]。一方、PC9 細胞から複数の研究室で独自に得られた EGFR-TKIs 耐性細胞は全て T790M 変異を伴っていた [45,70,71,72]。このことは、ゲフィチニブ耐性機構が、がん細胞のコンテキスト依存的に予め決定されていることを示唆している。今回の解析では、HCC827 細胞は CADM1 を発現していたが、PC9 細胞は発現していなかった。以上のことから、MET の活性を抑制していた CADM1 の発現が、何らかの機序によって欠如することにより MET 経路が活性化しゲフィチニブ耐性を獲得したと考え、耐性獲得前の腫瘍の CADM1 の発現の有無が、MET 活性化を介して耐性を獲得するかどうかを予測する分子マーカーとなる可能性が示唆された。今後、これらのことを解明するためには、ゲフィチニブに感受性を示す幾つかの肺腺がんの細胞株を用いて、耐性獲得前後における CADM1 の発現の有無を比較する必

要がある。また、耐性獲得前後のヒト組織検体を用いて、その耐性機構に応じたどのように **CADM1** の発現が変化するかを解析する必要がある。

さらに、**HCC827GR5** 細胞に **CADM1** を導入した **GR5/CADM1#1** 細胞、**GR5/CADM1#4** 細胞は、ゲフィチニブ感受性の回復を認めた。このことから、**MET** 過剰発現により耐性を獲得した肺腺がんの患者に対し、**CADM1** を導入することによりゲフィチニブの抗腫瘍効果を回復できる可能性も考えられる。将来的には、**CADM1** が **MET** 過剰発現による耐性化を来たした肺腺がんや、**MET** の過剰発現を認めるがんに対する治療へ応用できる可能性も考えられる。そのためには、今後、レトロウイルスなどをベクターとした、**CADM1** の遺伝子治療や、**MET** 抑制に必要とする最小限の **CADM1** の断片を同定し、創薬に結びつける基礎研究が必要と思われる。

結論

MET 遺伝子増幅によりゲフィチニブに対し耐性を示したヒト肺腺がん細胞においては、親細胞で認められた細胞接着分子 *CADM1* の発現が欠如していた。この耐性細胞に *CADM1* を導入すると、ゲフィチニブ感受性が回復した。このことから *CADM1* が肺腺がんのゲフィチニブ耐性克服に応用できる可能性が示された。また、肺腺がんにおいて *CADM1* の発現の有無が、*MET* の活性化を介したゲフィチニブに対する耐性を獲得するか否かを予測する分子マーカーとなりうると考えられた。

謝辞

本研究をまとめるにあたり御指導御鞭撻を賜りました指導教官である東京大学大学院医学系研究科呼吸器外科学講座の中島淳教授に深謝申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、研究の基礎から丁寧に御指導頂きました東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の村上善則教授に深謝申し上げます。また、病理診断など、様々な面で御指導御協力頂いた秋田大学大学院医学系研究科病態制御医学系器官病態学講座の後藤明輝教授に深謝申し上げます。そして、日々の研究生生活において様々な面で御指導御協力頂いた東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の岩井美和子博士、櫻井美佳助教、松原大祐講師、坪井裕見博士、斉藤杏里博士、伊東剛氏、増田智子氏、市原博美氏、花岡有紀氏、許淑真氏、中岡寛樹氏、小粥浩之氏、熊谷友紀氏、明石健氏、金谷淳志氏、顔暁珮氏、Osman Wael Mohammed氏、Reem Abdelrahim Ibrahim氏、東京大学医学部附属病院泌尿器科の川合剛人博士に感謝申し上げます。

参考文献

- 1 国立がん研究センターがん対策情報センター 人口動態統計によるがん死亡データ (1958年～2011年)

<http://ganjoho.jp/professional/statistics/statistics.html#01>

アクセス日時 平成25年3月6日
- 2 臨床・病理 肺癌取り扱い規約 2010年11月改訂 第7版 : 日本肺癌学会編

東京: 金原出版株式会社
- 3 EBMの手法による肺癌診療ガイドライン 2005年版 : 日本肺癌学会編 東京: 金原出版株式会社
- 4 Sawabata N, Miyaoka E, Asamura H, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Nomori H, Fujii Y, Okumura M, Yokoi K; Japanese Joint Committee for Lung Cancer

Registration : J Thorac Oncol. 2011 Jul;6 (7):1229-35.
- 5 Reungwetwattana T, Weroha SJ, Molina JR: Oncogenic pathways, molecularly targeted therapies, and highlighted clinical trials in non-small-cell lung cancer (NSCLC). Clin Lung Cancer. 2012 Jul;13 (4):252-66.
- 6 Coate LE, John T, Tsao MS, Shepherd FA.: Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. Lancet Oncol. 2009 Oct;10 (10):1001-10.
- 7 Jackie L. Johnson, Smitha Pillai, and Srikumar P. Chellappan: Genetic and

- Biochemical Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Biochem Res Int.* 2012;2012:1-18.
- 8 Mitsudomi T: Advances in Target Therapy for Lung Cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2010 Feb;40 (2):101-6.
- 9 Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T: KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2012 Feb;12;18 (3):375-7.
- 10 Katayama T, Matsuo K, Kosaka T, Sueda T, Yatabe Y, Mitsudomi T: Effect of gefitinib on the survival of patients with recurrence of lung adenocarcinoma after surgery: a retrospective case-matching cohort study. *Surg Oncol.* 2010 Dec ;19 (4) :144-9.
- 11 光富徹哉、谷田部恭、萩原弘一、弦間昭彦、西尾和人、秋田弘俊、中川和彦: 肺癌患者におけるEGFR 遺伝子変異検査の解説. 日本肺癌学会 EGFR 解説作成委員 第1.7 版2009 年5 月11 日
- <http://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/148.pdf>
- アクセス日時 平成25年3月6日

- 12 Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005 May;5 (5):341-54.
- 13 Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2 (2):127-37.
- 14 Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Baron AE, Zeng C, Franklin WA: Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003 Oct 15;21 (20):3798-807.
- 15 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA: Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib: *N Engl J Med*. 2004 May 20;350 (21):2129-39.
- 16 Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004 Jun 4;304 (5676):1497-500.

- 17 Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Barker AJ, Gibson KH: ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res.* 2002 Oct 15;62 (20): 5749-54.
- 18 Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y: Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer. *Int J Clin Oncol.* 2006 Jun;11 (3):190-8.
- 19 Mitsudomi T, Yatabe Y: Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci.* 2007 Dec;98 (12):1817-24.
- 20 Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M: Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009 Sep 3;361 (10):947-57.
- 21 Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba JL, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno MA, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sánchez JM, Bastus R, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina MA,

- Sanchez JJ, Taron M; Spanish Lung Cancer Group: Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med.* 2009 Sep 3;361(10):958-67.
- 22 Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cospers AK, Akhavanfard S, Heist RS, Temel J, Christensen JG, Wain JC, Lynch TJ, Vernovsky K, Mark EJ, Lanuti M, Iafrate AJ, Mino-Kenudson M, Engelman JA: Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011 Mar 23;3(75):75ra26.
- 23 Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005 Feb 24;352(8):786-92.
- 24 Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA: MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007 May 18;316(5827):1039-43.
- 25 Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude

- GF: Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*. 1984 Sep 6-11;311 (5981):29-33.
- 26 Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF: Mechanism of met oncogene activation. *Cell*. 1986 Jun 20;45 (6):895-904.
- 27 Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W: The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol*. 1993 Apr;121 (1):145-54.
- 28 Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM: The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Mar;27 (1):85-94.
- 29 Bardelli A, Longati P, Gramaglia D, Stella MC, Comoglio PM: Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* 1997 Dec 18;15 (25):3103-11.
- 30 Taher TE, Tjin EP, Beuling EA, Borst J, Spaargaren M, Pals ST: c-Cbl is involved in Met signaling in B cells and mediates hepatocyte growth factor-induced receptor ubiquitination. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169 (7):3793-800.
- 31 Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W:

- Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol.* 2000 Jun 26;149 (7):1419-32.
- 32 Patric C, Gautam M, James C, Ravi S: c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* 2003 Dec;22 (4):309-25.
- 33 Cipriani NA, Abidoeye OO, Vokes E, Salgia R: MET as a target for treatment of chest tumors. *Lung Cancer.* 2009 Feb;63 (2):169-79.
- 34 Ito A, Okada M, Uchino K, Wakayama T, Koma Y, Iseki S, Tsubota N, Okita Y, Kitamura Y: Expression of the TSLC1 adhesion molecule in pulmonary epithelium and its down-regulation in pulmonary adenocarcinoma other than bronchioloalveolar carcinoma. *Lab Invest.* 2003 Aug;83 (8):1175-83.
- 35 Uchino K, Ito A, Wakayama T, Koma Y, Okada T, Ohbayashi C, Iseki S, Kitamura Y, Tsubota N, Okita Y, Okada M: Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung. *Cancer.* 2003 Sep 1;98 (5):1002-7.
- 36 Murakami Y: Functional cloning of a tumor suppressor gene, TSLC1, in human non-small cell lung cancer. *Oncogene.* 2002 Oct 7;21 (45):6936-48.
- 37 Satoh H, Lamb PW, Dong JT, Everitt J, Boreiko C, Oshimura M, Barrett JC: Suppression of tumorigenicity of A549 lung adenocarcinoma cells by human

- chromosomes 3 and 11 introduced via microcell-mediated chromosome transfer.
Mol Carcinog. 1993;7 (3):157-64.
- 38 Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y: TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. Nat Genet. 2001 Apr;27 (4):427-30.
- 39 Gomyo H, Arai Y, Tanigami A, Murakami Y, Hattori M, Hosoda F, Arai K, Aikawa Y, Tsuda H, Hirohashi S, Asakawa S, Shimizu N, Soeda E, Sakaki Y, Ohki M: A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. Genomics. 1999 Dec 1;62 (2):139-46.
- 40 Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, Murakami Y: The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. J Biol Chem. 2002 Aug 23;277 (34):31014-9.
- 41 Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Maruyama T, Ito A, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y: Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary nonsmall cell lung carcinoma. Cancer. 2006 Apr 15;106(8):1751-8.

- 42 Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y: Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2005 Apr 15;11 (8):2954-61.
- 43 永田政義 腎がんおよび肺がんにおけるCADM ファミリー細胞接着分子群の意義に関する研究 東京大学大学院医学系研究科博士論文 2010 (未公刊)
- 44 Masuda M, Kikuchi S, Maruyama T, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Ghosh HP, Murakami Y: Tumor suppressor in lung cancer (TSLC)1 suppresses epithelial cell scattering and tubulogenesis. J Biol Chem. 2005 Dec 23;280 (51):42164-71.
- 45 Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, Nishio K.: Establishment of a human non-small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. Int J Cancer. 2005 Aug 10;116 (1):36-44.
- 46 Okamoto W, Okamoto I, Tanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Yamaguchi H, Arai T, Nishio K, Fukuoka M, Jänne PA, Nakagawa K: TAK-701, a humanized monoclonal antibody to hepatocyte growth factor, reverses gefitinib resistance induced by tumor-derived HGF in non-small cell lung cancer with an EGFR mutation. Mol Cancer Ther. 2010 Oct;9 (10):2785-92.
- 47 Miyawaki A, Furuichi T, Maeda N, Mikoshiba K: Expressed cerebellar-type

- inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, P400, has calcium release activity in a fibroblast L cell line. *Neuron*. 1990 Jul;5 (1):11-8.
- 48 Iwasa S, Tabara H, Song Z, Nakabayashi M, Yokoyama Y, Fukushima T: Inhibition of D-amino acid oxidase activity by antipsychotic drugs evaluated by a fluorometric assay using D-kynurenine as substrate. *Yakugaku Zasshi*. 2011;131 (7):1111-6.
- 49 Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S: Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 15;17 (8):2260-9.
- 50 Baselga J, Rischin D, Ranson M, Calvert H, Raymond E, Kieback DG, Kaye SB, Gianni L, Harris A, Bjork T, Averbuch SD, Feyereislova A, Swaisland H, Rojo F, Albanell J: Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 1; 20 (21) :4292-302.
- 51 Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Nishioka Y, Uehara H, Mitsudomi T, Yatabe Y,

- Nakamura T, Sone S: Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res.* 2008 Nov 15;68 (22):9479-87.
- 52 Janjigian YY, Groen HJ, Horn L, Smit EF, Fu Y, Wang F, Shahidi M, Denis LJ, Pao W, Miller VA: Activity and tolerability of afatinib (BIBW 2992) and cetuximab in NSCLC patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 7525^).
http://www.asco.org/ASCOv2/Meetings/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=102&abstractID=78057 アクセス日時平成24年11月1日
- 53 Feng Y, Thiagarajan PS, Ma PC: MET signaling: novel targeted inhibition and its clinical development in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012 Feb;7 (2):459-67.
- 54 Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, Takamoto S, Murakami Y. Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2003 Oct 20;107 (1):53-9.
- 55 Hui AB, Lo KW, Kwong J, Lam EC, Chan SY, Chow LS, Chan AS, Teo PM, Huang DP. Epigenetic inactivation of TSLC1 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog.* 2003 Dec;38 (4):170-8.
- 56 Lung HL, Cheng Y, Kumaran MK, Liu ETB, Murakami Y, Chan CY, Yau WL,

- Stanbridge EJ, Lung ML: Fine mapping of the 11q22-23 tumor suppressive region and involvement of TSLC1 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 2004 Nov 20;112 (4):628-35.
- 57 Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, Murakami Y, Imamura M. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Oct 1;63 (19):6320-6.
- 58 Honda T, Tamura G, Waki T, Jin Z, Sato K, Motoyama T, Kawata S, Kimura W, Nishizuka S, Murakami Y. Hypermethylation of the TSLC1 gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res*. 2002 Aug;93 (8):857-60.
- 59 Jansen M, Fukushima N, Rosty C, Walter K, Altink R, Heek TV, Hruban R, Offerhaus JG, Goggins M: Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. *Cancer Biol Ther*. 2002 May-Jun;1 (3):293-6.
- 60 Allinen M, Peri L, Kujala S, Lahti-Domenici J, Outila K, Karppinen SM, Launonen V, Winqvist R. Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Aug;34 (4):384-9.

- 61 Steenbergen RD, Kramaer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, Snijders PJ: TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Feb 18;96 (4):294-305.
- 62 Li J, Zhang Z, Bidder M, Funk MC, Nguyen L, Goodfellow PJ, Rader JS: IGSF4 promoter methylation and expression silencing in human cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2005 Jan;96 (1):150-8.
- 63 Chen K, Wang G, Peng L, Liu S, Fu X, Zhou Y, Yu H, Li A, Li J, Zhang S, Bai Y, Zhang Y: CADM1/TSLC1 inactivation by promoter hypermethylation is a frequent event in colorectal carcinogenesis and correlates with late stages of the disease. *Int J Cancer.* 2011 Jan 15;128 (2):266-73.
- 64 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 Ther.* 2012 Sept 3, 379-387.
- 65 Guo A, Villén J, Kornhauser J, Lee KA, Stokes MP, Rikova K, Possemato A, Nardone J, Innocenti G, Wetzel R, Wang Y, MacNeill J, Mitchell J, Gygi SP, Rush J, Polakiewicz RD, Comb MJ: Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan 15;105(2):692-7.

- 66 Mao X, Seidlitz E, Ghosh K, Murakami Y, Ghosh HP: The cytoplasmic domain is critical to the tumor suppressor activity of TSLC1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):7979-85.
- 67 Kawano S, Ikeda W, Kishimoto M, Ogita H, Takai Y: Silencing of ErbB3/ErbB2 signaling by immunoglobulin-like Necl-2. *J Biol Chem.* 2009 Aug 28;284 (35):23793-805.
- 68 Suda K, Murakami I, Katayama T, Tomizawa K, Osada H, Sekido Y, Maehara Y, Yatabe Y, Mitsudomi T: Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer.
- 69 Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, Toschi L, Rogers A, Mok T, Sequist L, Lindeman NI, Murphy C, Akhavanfard S, Yeap BY, Xiao Y, Capelletti M, Iafrate AJ, Lee C, Christensen JG, Engelman JA, Jänne PA: Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell.* 2010 Jan 19;17 (1):77-88.
- 70 Shien K, Ueno T, Tsukuda K, Soh J, Suda K, Kubo T, Furukawa M, Muraoka T, Maki Y, Tanaka N, Yamamoto H, Kiura K, Mitsudomi T, Toyooka S, Miyoshi S: Knockdown of the epidermal growth factor receptor gene to investigate its

therapeutic potential for the treatment of non-small-cell lung cancers. *Clin Lung Cancer*. 2012 Nov;13 (6):488-93.

- 71 Godin-Heymann N, Ulkus L, Brannigan BW, McDermott U, Lamb J, Maheswaran S, Settleman J, Haber DA: The T790M "gatekeeper" mutation in EGFR mediates resistance to low concentrations of an irreversible EGFR inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2008 Apr;7 (4):874-9.
- 72 Chmielecki J, Foo J, Oxnard GR, Hutchinson K, Ohashi K, Somwar R, Wang L, Amato KR, Arcila M, Sos ML, Socci ND, Viale A, de Stanchina E, Ginsberg MS, Thomas RK, Kris MG, Inoue A, Ladanyi M, Miller VA, Michor F, Pao W: Optimization of dosing for EGFR-mutant non-small cell lung cancer with evolutionary cancer modeling. *Sci Transl Med*. 2011 Jul 6;3 (90):90ra59