

博士論文 (要約)

肺腺がんにおける Hippo 経路の
細胞接着分子 CADM1 による制御機構

中村 敦子

【目的と背景】

肺がんは日本人の臓器別のがん死亡原因の第一位で、罹患者数は増加傾向にある。この肺がんの50%以上を占める肺腺がんは、肺胞上皮細胞において *EGFR* 変異や *KRAS* 変異などの遺伝子異常をきたすことによりがん化する。肺胞上皮置換性に増殖する上皮内腺がんは、がん抑制遺伝子 *TP53* 不活化やがん遺伝子 *c-MET* の増幅などの遺伝子異常により浸潤がんへ進展し、浸潤がんにおいて *CADM1* (*Cell adhesion molecule 1*) は高頻度に不活化されている。非小細胞肺がんは化学療法や放射線療法に対する抵抗性が高く、その発症と進展の分子メカニズムを解明することにより新規治療や既存の分子標的治療の耐性を克服する新たな分子標的を見出すことが求められている。

CADM1 は、非小細胞肺がんにおいてがん抑制遺伝子産物として同定された免疫グロブリンスーパーファミリーに属する一回膜貫通型の細胞接着分子で、その発現欠如は腫瘍径、病期、リンパ節転移、血管浸潤、予後不良等と相関する。*CADM1* は細胞接着面に集積し、ホモ二量体を形成して細胞間接着及び上皮構造の形成、維持に関与する。*CADM1* の細胞内領域には、4.1 結合モチーフと PDZ 結合モチーフが認められる。肺腺がん細胞株 A549 に *CADM1* を発現させるとヌードマウスでの腫瘍原性を抑制する一方、細胞内領域を欠失した *CADM1* 変異体は腫瘍増殖を抑制しないことから、4.1 結合モチーフまたは PDZ 結合モチーフと相互作用する分子は腫瘍抑制に重要な役割を果たすと考えられる。4.1 結合モチーフと PDZ 結合モチーフは、それぞれ 4.1 ファミリー分子群と膜結合型グアニル酸キナーゼ分子群 (MAGuKs: membrane-associated guanylate kinases) と結合するが、これら、裏打ちタンパク質群は Hippo 経路への関与が報告されている。神経鞘腫や髄膜腫、悪性中皮腫で不活化されている NF2/Merlin は 4.1 ファミリーに属し、Hippo 経路を介した悪性形質の獲得に関与している。

Hippo 経路は、細胞接着及び極性形成により活性化され、細胞増殖の接触阻害や器官サイズを制御するシグナル伝達経路である。Hippo 経路は細胞外からの刺激を受けて、セリン・スレオニンキナーゼ MST-LATS 経路が活性化し、転写共役因子 YAP1/TAZ をリン酸化して不活化する経路で、ショウジョウバエからヒトに至るまで広く保存されている。裏打ちタンパク質 FRMD6/Willin、NF2/Merlin、WWC1/Kibra は細胞外からのシグナルを MST に伝達する。YAP1 は Hippo 経路のエフェクター分子で、転写因子 TEAD と複合体を形成して細胞の増殖やアポトーシスの抑制に関わる遺伝子の発現を誘導する。Hippo 経路が活性化されると LATS により YAP1 の Ser127 がリン酸化され、YAP1 は 14-3-3 と結合して核から細胞質へと局在が移行し、転写共役因子として細胞の増殖やアポトーシスを抑制する機能を失う。様々な悪性腫瘍において Hippo 経路分子の発現異常が報告され、*Nf2*、*Mst1/2*、*Sav1*、*Lats1/2*、*Mob1*、*YAP1* 遺伝子改変マウスにおいてがんの発症を認めたことから、Hippo 経路の制御の破綻は腫瘍の形成及び進展を促進すると考えられている。非小細胞肺がん症例において YAP1 は高発現し、その発現は病期の進行やリンパ節転移、予後不良と相関する。また、YAP1 は非小細胞肺がん細胞の増殖、遊走を促進することが報告されている。

細胞外からの刺激を Hippo 経路へ伝達する制御分子として、ショウジョウバエにおいては非典型的カドヘリン Dachous (Ds) と Fat (Ft) 及び免疫グロブリンドメインを有する接着分子 Echinoid (Ed) が知られている。Ds は Ft のリガンドとして機能し、隣接する細胞間でヘテロフィリック結合を形成する。Ft は裏打ちタンパク質 Expanded (Ex) を細胞膜にリクルートすることにより Hippo 経路を活性化する。Ed は Adherence junction において二量体を形成し、細胞質で MST のホモログ Hpo のアダプター分子 Salvador (Sav) と結合して安定化することにより YAP1 のホモログ Yorkie (Yki) を不活化する。哺乳類においては細胞表面糖タンパク質である CD44 は NF2 と相互作用し、Hippo 経路の活性化を抑制すること、細胞極性に関わる細胞表面受容体 Crumbs (Crb) が MPP5、PATJ、AMOT を含む極

性複合体を形成し、YAP1 と相互作用して細胞質に保持することで YAP1 を不活化するという機構が報告されている。組織ごとに Hippo 経路を制御する分子は異なると考えられているが、哺乳類において細胞接着シグナルを Hippo 経路の活性化へとつなぐ分子機構は解明されていない。そこで、本研究では、CADM1 が Hippo 経路の制御に関与するかどうかを肺上皮、肺腺がんにおいて明らかにすることを目的として検討を行った。

【方法と結果】

1. 高密度培養下の非小細胞肺癌細胞における CADM1 による Hippo 経路の活性化

非小細胞肺癌において CADM1 の Hippo 経路への関与を明らかにするために、上皮様の細胞形態を示し、CADM1 発現の低い肺腺がん細胞株 HCC827 において、レンチウイルスを用いて CADM1 安定発現株を作成した。発現ベクターを導入したコントロール株及び CADM1 発現株を細胞数 2.0×10^5 または 1.0×10^6 個で 6 cm ディッシュに播種して 3 日間培養し、ウェスタンブロットにより Hippo 経路構成分子の発現及びリン酸化を検討した。低密度及び高密度の培養条件において、CADM1 発現株で YAP1 及び LATS1/2 の発現は変化しなかったが、高密度で培養した飽和密度状態の CADM1 発現株においてのみ、YAP1 のリン酸化が亢進した。したがって、CADM1 は隣接細胞間のトランス・ホモフィリック結合を介して YAP1 のリン酸化を亢進することが予想された。

YAP1 はリン酸化されると 14-3-3 により細胞質へ局在が移行して転写共役因子としての機能を失う。そこで、CADM1 が YAP1 の転写活性化能に及ぼす影響を明らかにするために、YAP1 の標的遺伝子である *ANKRD1* (Ankyrin repeat domain 1) 及び *CYR61/CCN1* の mRNA の発現を qRT-PCR により検討した。*ANKRD1* は肥大型心筋症の原因遺伝子で、機械的伸展により核に局在が移行する転写関連因子である。*CYR61* は CCN (*CYR61/CTGF/NOV*) ファミリーに属する細胞外マトリックスの構成タンパク質をコードし、*CYR61* タンパク質は非小細胞肺癌細胞ではインテグリンとの相互作用により細胞の遊走を促進する。高密度培養条件下の CADM1 発現株において *ANKRD1* 及び *CYR61* 発現が有意に減少した。したがって、CADM1 は飽和細胞密度状態で YAP1 のリン酸化を亢進し、それに伴って YAP1 の転写活性化能を低下させることが示唆された。

2. CADM1 と相互作用する Hippo 経路構成因子の検討

次に、CADM1 がどのような分子機構により YAP1 を制御するかを明らかにするために、CADM1 と相互作用し得る Hippo 経路構成因子について検討した。V5 タグを付加した Hippo 経路構成分子である 14-3-3 η 、AMOTp80、AMOTL1、KIBRA、Merlin、MST1/2、LATS1/2、YAP1 を 293FT 細胞に一過的に発現させ、抗 CADM1 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、抗 V5 タグ抗体を用いたウェスタンブロット法により、14-3-3 η 、AMOTL1、KIBRA、Merlin、MST1/2、LATS1/2 は各々対応するシグナルを検出し、抗 CADM1 抗体を用いた共免疫沈降実験において CADM1 との共沈を認めた。Hippo 経路におけるこれら分子の機能としては、14-3-3 は YAP1 の細胞内局在を制御し、リン酸化 YAP1 を細胞質及び細胞膜にリクルートすることによって不活化すること、AMOTL1 は LATS2 と結合して LATS2 及び YAP1 のリン酸化を誘導すること、KIBRA は LATS2 と結合し、ユビキチン化を阻害することにより LATS2 を安定化し、YAP1 をリン酸化すること、MST 及び LATS は Hippo 経路の中心分子として機能するキナーゼで YAP1 のリン酸化を直接制御することなどが知られている。したがって、CADM1 はこれらの分子を介して Hippo 経路を活性化し、YAP1 を制御する可能性が強く示唆された。

3. 非小細胞肺癌における CADM1、LATS2、YAP1 の発現の免疫組織化学的解析

TCGA データベース解析によって肺腺がんにおける予後との相関が報告されている LATS2 は YAP1 を直接的に制御するキナーゼであり、共免疫沈降法により CADM1 との複合体形成を認めたことから、CADM1 及び LATS2 について肺腺がんの免疫組織化学的検討を行った。低悪性度症例では CADM1 と LATS2 は主に細胞膜に局在を認め、CADM1 及び LATS2 を発現する症例は予後良好であった。さらに、CADM1 陽性群と陰性群とに区分して、LATS2 細胞内局在と予後について生存分析を行った。その結果、CADM1 陰性症例では LATS2 の細胞内局在の違いによる生存率に差を認めないが、CADM1 陽性症例では LATS2 細胞膜陽性症例は、細胞質陽性症例及び陰性症例に比べて有意に生存率が高く、CADM1 と LATS2 との相互作用が肺腺がんにおける腫瘍抑制に重要であることが示唆された。

抗 YAP1 抗体を用いた肺腺がんの免疫組織染色では、低悪性度症例は高悪性度症例に比べて YAP1 の核局在が有意に高頻度に見られたが、YAP1 が核に局在する高悪性度症例も見られた。しかしながら、生存期間解析において核内 YAP1 陽性症例と陰性症例との予後に有意な差を認めなかった。さらに CADM1 または LATS2 を陽性群と陰性群とに区分して、核内 YAP1 と予後について生存期間解析を行った。特に LATS2 陰性症例において核内 YAP1 は予後不良と相関を示したことから、CADM1、LATS2 による制御が失われると核内 YAP1 は悪性化に寄与することが示唆された。

【結論】

細胞接着分子 CADM1 は、Hippo 経路を介して、細胞接着の刺激を Hippo 経路に伝達し、細胞増殖の接触阻止に関わる細胞膜分子として機能することが示唆され、その欠如はがん細胞の増殖を促進すると考えられる。