

論文の内容の要旨

論文題目 小細胞肺がんの悪性化における細胞接着分子 CADM1 の機能解析

氏名 舩城桐子

【研究背景と目的】

肺がんは罹患数、死亡数ともに世界第1位のがん種であり、そのうち約15%を占めるがん種が小細胞肺がん (Small cell lung cancer : SCLC) である。SCLCは非小細胞肺がんと比較して増殖が速く、早期から脳、骨、肝臓への転移が認められる難治がんである。初回化学療法は奏功するが再発率が高く、5年生存率は10%以下と予後不良である。遺伝子異常は*TP53*、*RBI*の欠失が90%以上の症例で認められるが¹、治療標的となるドライバー変異の頻度が低く、分子標的薬の開発が遅れている。また腫瘍は神経内分泌腫瘍の特徴を示すが、腫瘍内不均一性が高く、高頻度に薬剤耐性を獲得するなど、治療は難航しており、新規治療法の確立が必要とされる。

SCLCで高発現している分子の一つに、CADM1 (Cell adhesion molecule1) がある。CADM1は上皮構造の維持に関与する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、当研究室において上皮がんにおけるがん抑制遺伝子産物として同定された²。一方で先行研究においてCADM1は、ヒトSCLC培養細胞株の90%に高発現しており、ヌードマウスにおいて腫瘍原性を促進することを明らかにしている³。またCADM1は正常組織では精巣でしか発現しないスプライシングバリエントv8/9をSCLC特異的に発現しており、その細胞外領域の遊離断片はSCLCの診断マーカーとして有用であることを当研究室で報告している⁴。このように、CADM1はSCLCで高発現し、悪性化に寄与することが予想されるが、その詳細な機能は明らかにされていない。そこで本研究はSCLCの悪性化におけるCADM1の機能を明らかにし、SCLCの新たな分子標的の同定と治療開発の一助とすることを目的として行った。

【方法と結果】

1. SCLCにおけるCADM1発現の制御機構と病理学的意義

SCLCにおけるCADM1の発現と病理学的意義について理解するために、CADM1のC末端をエピトープとする抗体を用いて44症例のSCLC病理組織の免疫組織化学を行った。その結果、CADM1はSCLC切除症例の75%に発現しており、またSCLCを含む肺の高悪性度神経内分泌腫瘍において、CADM1を強く発現している症例は予後不良を示し、リンパ節転移と相関があることが明らかになった。

SCLC を発生するマウスモデルとして、*Trp53/Rb1* double flox マウスの肺に Cre リコンビナーゼを発現するアデノウイルス (Ad-Cre) を経気道投与後、約 200-300 日後に腫瘍を発生するモデルが確立されている⁴。この SCLC モデルマウスにおける腫瘍は *Cadm1* mRNA の発現が確認されたため、このマウスに *Cadm1* flox マウスを交配した *Trp53/Rb1/Cadm1* flox マウスを作製し、*Trp53/Rb1* double flox マウスと SCLC の増殖、病態、生存期間の比較を行った。その結果、CADM1 の欠失により生存期間の延長および解剖時におけるリンパ節転移数の減少が認められ、ヒト SCLC 症例と一致する知見が得られた。

次に SCLC 症例における CADM1 の発現と神経内分泌マーカーの発現を、免疫組織化学により解析したところ、CADM1 の発現は NCAM、Chromogranin A、Synaptophysin そして YAP1 との相関は認められなかったが、神経内分泌分化に関わる転写因子 INSM1 (Insulinoma-associated protein 1) の発現と相関が認められ、また NE マーカーである ASCL1 (Achaete-scute homolog 1) ともわずかに相関が認められた。そこで、CADM1 の発現制御に INSM1 および ASCL1 が寄与している可能性を考えた。CADM1 の翻訳開始点から上流約 1,200 bp より順次断片化した変異体を用いてルシフェラーゼアッセイを行い、CADM1 の転写に寄与するプロモーター領域を絞り込んだところ、INSM1 結合予測配列を含む上流 354 bp と 147 bp との間に顕著な転写活性の抑制を認めた。そこで ChIP-PCR 法を用いて INSM1 が CADM1 プロモーターに作用し得るかどうか確認したところ、抗 IgG 抗体と比較して抗 INSM1 抗体で共沈した際に、DNA 断片の有意な増幅を認めた。このことから、INSM1 は CADM1 プロモーターに結合し、CADM1 の転写を活性化していることが示唆された。

2. SCLC の増殖と転移における CADM1 の機能解析

SCLC の増殖における CADM1 の機能を評価するために、CADM1 を発現しているヒト SCLC 培養細胞株である NCI-H446 細胞の CADM1 ノックアウト細胞を作製し、ヌードマウスにおける皮下腫瘍増殖を評価した。その結果、CADM1 の欠失により、H446 細胞の増殖が有意に抑制された (図 1)。また、SCLC と同様に高悪性度肺神経内分泌腫瘍に含まれる大細胞神経内分泌がんの細胞株である VMRC-LCD 細胞の CADM1 をノックアウトし、皮下腫瘍増殖を評価したところ、腫瘍増殖の有意な抑制を認めた。さらに、SCLC の転移における CADM1 の機能を評価するために、CADM1 の発現が低いヒト SCLC 培養細胞株である NCI-N417 細胞の CADM1 過剰発現細胞を作製し、ヌードマウスへの肺同所移植による転移能を評価した。その結果、CADM1 の発

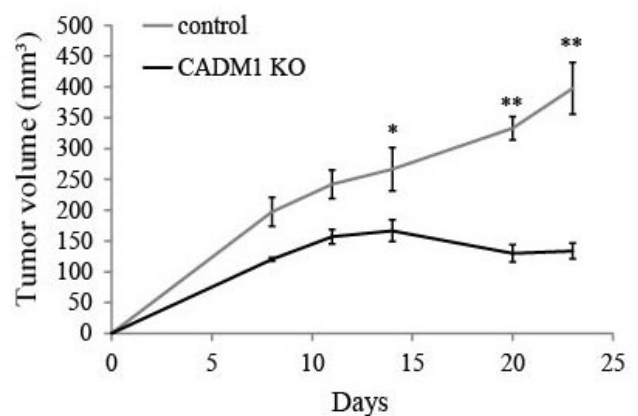


図 1. CADM1 は SCLC 細胞の皮下腫瘍増殖を促進する
ヌードマウスにおける NCI-H446 細胞の皮下腫瘍体積 (n=6, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

現により、N417 細胞の縦隔リンパ節への転移が有意に促進された。以上のことから、CADM1 は SCLC 細胞の増殖と転移の両方を促進する可能性が示唆された。

次に、増殖促進に寄与する CADM1 の責任領域の同定を行った。CADM1 は細胞外に 3 つの免疫グロブリン様ループ、細胞内に 4.1 タンパク質結合モチーフおよび PDZ II 結合モチーフを有するが、これらの領域の活性喪失変異体を、CADM1 を発現していないヒト SCLC 培養細胞株の SBC5 細胞に導入し、コロニー形成能を評価した。その結果、CADM1 の導入により SBC5 細胞のコロニー形成は有意に促進されたが、4.1 タンパク質結合モチーフの変異によりその促進は有意に抑制された。またこれらの変異体を用いてヌードマウスにおける皮下移植を行ったところ、コロニー形成と同様に、4.1 タンパク質結合モチーフ変異体では腫瘍増殖が CADM1 発現細胞と比較して有意に抑制されたが、さらに細胞外領域の接着不全変異体でも有意な抑制を認めた。このことから SCLC 細胞の足場非依存的な増殖促進には細胞内の 4.1 タンパク質結合モチーフが重要であり、また *in vivo* においては、細胞外領域も重要であることが示唆された。

次に、足場非依存的な増殖の促進において、CADM1 の細胞内領域の 4.1 タンパク質結合モチーフに相互作用する分子を同定した。アクチン結合タンパク質である 4.1 タンパク質は 4.1R、4.1N、4.1G、4.1B の 4 種類が知られているが、SCLC 細胞では 4.1R、4.1N、4.1G の発現が認められた。そこでこれら 3 つの 4.1 タンパク質と CADM1 の局在について、H446 細胞の CADM1 ノックアウト細胞を用いて免疫蛍光染色により確認したところ、コントロール細胞では CADM1 と 4.1R の両方が細胞膜に局在が認められたのに対し、CADM1 ノックアウト細胞では 4.1R の膜局在が喪失した。一方で、4.1N、4.1G については、CADM1 の発現によらず、膜局在が認められた。このことから、SCLC では 4.1R が CADM1 に特異的に細胞膜にリクルートされることが示唆された。また、4.1R が SCLC の足場非依存的な増殖に与える影響を評価するため、SBC5 細胞の vector 細胞と CADM1 発現細胞の 4.1R を、shRNA を用いてノックダウンし、コロニー形成を評価したところ、vector 細胞と CADM1 細胞の両方のコロニー形成が有意に抑制され、CADM1 による増殖の促進が喪失した。このことから、CADM1 は 4.1R を膜にリクルートすることを介して、SCLC の足場非依存的な増殖を促進していることが示唆された。さらに、ヒト SCLC 28 症例における CADM1 の発現と 4.1R の発現を免疫組織化学により解析したところ、4.1R の発現は全症例に認められ、また CADM1 の発現と 4.1R の膜局在は有意に相関が認められた。さらに、臨床病理学的因子について解析したところ、CADM1 陽性かつ 4.1R が膜局在の症例は、それ以外の症例と比較して、病期ステージが有意に高かった。このことから、CADM1 は SCLC 症例においても、4.1R を膜にリクルートすることを介して SCLC の悪性化に寄与していることが考えられた。

次に、CADM1 による SCLC の足場非依存的な増殖促進に寄与する分子を明らかにするために、170 種類の阻害剤ライブラリーを用いて、CADM1 発現細胞の増殖促進のみを抑制する薬剤をスクリーニングした。その結果、PI3K 阻害剤、Akt 阻害剤、PKA 阻害剤、CXCR4 阻害剤に、各々抑制効果を見出した。実際に NCI-H69 細胞の CADM1 を Doxycycline 誘導性にノックダウン

すると、CADM1 の発現抑制により Akt のリン酸化が抑制されることをウェスタンブロッティングにより確認した。

CXCR4 は 7 回膜貫通型の GPCR で、下流の PI3K/Akt シグナル経路や PKA 経路を活性化することが知られている⁵。CXCR4 が CADM1 依存的な SCLC の増殖に寄与しているかを評価するために、SBC5 細胞の CADM1 発現細胞を用いてヌードマウスにおける皮下移植を行い、CXCR4 阻害剤 AMD3100 を腹腔内注射により投与した。その結果、CXCR4 阻害剤の添加により、CADM1 発現細胞の増殖のみが有意に抑制された。また SBC5 細胞では CADM1 の発現により Akt のリン酸化が亢進されるが、その活性化は shCXCR4 の導入により失われることをウェスタンブロッティングにより確認した。以上のことから、CADM1 は CXCR4 シグナル経路を介して下流の PI3K/Akt 経路を活性化し、SCLC 細胞の足場非依存的な増殖を促進している可能性が示唆された。

本研究により、CADM1 は SCLC に高発現し、SCLC の増殖およびリンパ節転移を促進することが明らかになった。また CADM1 の発現は INSM1 と相関し、INSM1 により転写が活性化されることが示唆された。CADM1 による増殖促進の分子機構として、CADM1 は 4.1R を膜にリクルートすることおよび CXCR4-PI3K 経路を介して SCLC の増殖を促進している可能性が示唆された (図 2)。

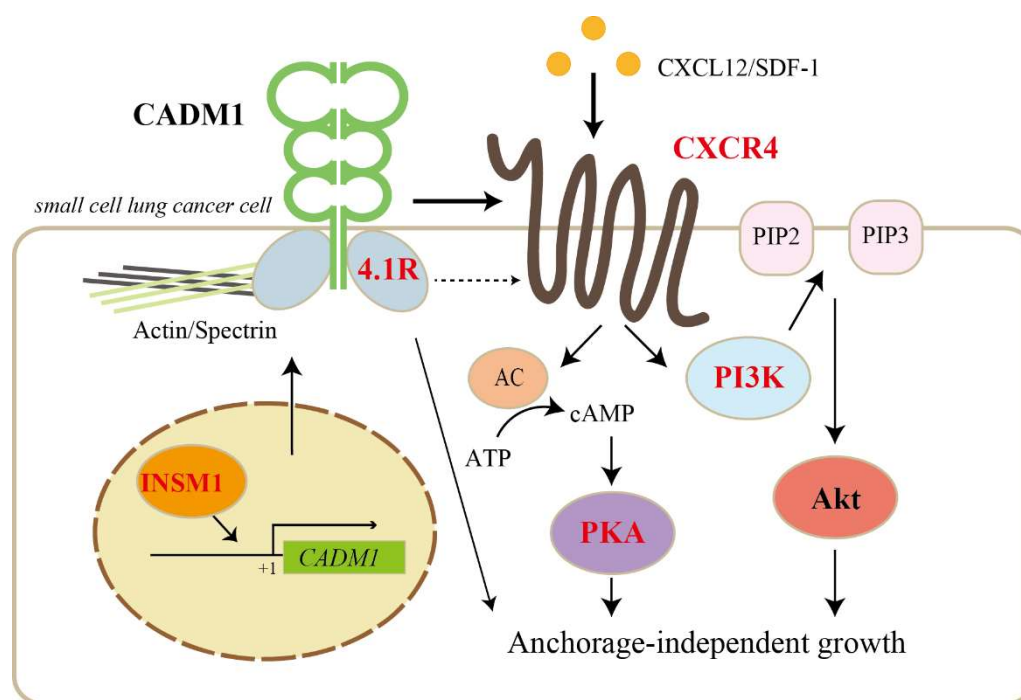


図 2. CADM1 による SCLC 細胞の増殖促進において予想される分子機構

1. George J et al., *Nature*, 2015. 2. Kuramochi M et al., *Nat Genet*, 2001. 3. Kikuchi S et al., *Cancer Sci*, 2012.
4. Meuwissen et al., *Cancer Cell*, 2003. 5. Beverly A et al., *Clin Cancer Res*, 2010.
- a. 特許 CADM1 v9 認識抗体、PCT 出願、PCT/JP2019/011201, 2019/3/18.