

審査の結果の要旨

氏名 船城 桐子

本研究では、小細胞肺癌 (Small cell lung cancer: SCLC) において高発現する CADM1 の機能解析を行い、治療薬の開発が難航する SCLC の新規標的分子の同定と治療開発の一助とすることを目的とした。SCLC 症例における CADM1 発現の病理学的意義および高発現機構の解析、そして SCLC の増殖と転移における CADM1 の機能解析を行い、以下の結果を得た。

1. SCLC 切除症例における CADM1 の発現を免疫組織化学により解析し、CADM1 は SCLC 症例の 75% に発現することを明らかにした。また SCLC を含む高悪性度肺神経内分泌腫瘍では、CADM1 の発現と予後およびリンパ節と相関が認められた。
2. SCLC モデルマウスとして *Trp53/Rb1 double flox* マウスに Cre リコンビナーゼを発現するアデノウイルスを経気道的に導入するモデルが確立されており、さらに *Cadm1 flox* マウスを交配した *Trp53/Rb1/Cadm1 triple flox* マウスを作製した。これらのマウスにおける生存期間および病態について解析し、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の減少を認めた。また両マウスに発生した腫瘍は神経内分泌の特徴を示し、CADM1 の発現は神経内分泌のサブタイプには影響を及ぼさないことが示唆された。
3. SCLC 切除症例における 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、CADM1 の発現は NCAM、Chromogranin A、Synaptophysin、YAP1 との相関は認めなかったが、神経内分泌分化に寄与する転写因子 INSM1 (Insulinoma-associated protein 1) と有意な相関を示すことを明らかにした。また SCLC 細胞の INSM1 の発現を siRNA によりノックダウンしたところ、INSM1 の発現抑制により、CADM1 の発現が顕著に抑制された。さらにルシフェラーゼアッセイおよびクロマチン免疫沈降-PCR 法により、INSM1 が CADM1 プロモーターに結合し CADM1 の転写活性を促進していることが示された。
4. ヒト SCLC 培養細胞株を用いてのヌードマウスにおける皮下腫瘍増殖を行ったところ、CADM1 は SCLC 細胞の腫瘍増殖を促進し、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肺神経内分泌がんの培養細胞株においても同様に CADM1 は皮下腫瘍増殖を促進した。また、肺同所移植によるリンパ節転移を評価したところ、CADM1 の発現により縦隔リンパ節転移が促進された。
5. 増殖促進における CADM1 の責任領域を同定する目的で、CADM1 のトランス・ホモ結合の接着不全変異体、細胞内領域の 4.1 タンパク質結合モチーフ変異体、PDZ II 結合モチーフ変

異体を、CADM1 を発現していないヒト SCLC 培養細胞株である SBC5 細胞に導入し、軟寒天培地コロニー形成アッセイを評価した。その結果、CADM1 による SCLC 足場非依存的な増殖促進には、細胞内領域の 4.1 タンパク質結合モチーフが重要であることが示唆された。

6. CADM1 の 4.1 タンパク質結合モチーフに相互作用する分子を解析するため、4.1 タンパク質について免疫蛍光染色をしたところ、4.1R が SCLC において特異的に CADM1 により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 細胞の足場非依存的な増殖に与える影響を評価するため、SBC5 の vector 細胞と CADM1 発現細胞に sh4.1R を導入し、コロニー形成能を評価した。その結果、4.1R の発現抑制はコントロール細胞と CADM1 発現細胞の両方のコロニー形成を有意に抑制し、CADM1 による増殖の促進は抑制された。さらに、ヒト SCLC 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 は全症例に発現を認め、CADM1 の発現と 4.1R の膜局在は有意な相関を認めた。また、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有意に病期のステージが高かった。
7. CADM1 による SCLC の足場非依存的な増殖促進に関わるシグナル分子の同定を、機能既知の 170 種類の阻害剤ライブラリーを用いて絞り込んだ。その結果、SBC5 細胞のコントロール細胞では増殖の抑制を認めず、CADM1 発現細胞においてのみ増殖の抑制を認めた薬剤として、PI3K 阻害剤、PKA 阻害剤、CXCR4 阻害剤が得られた。CADM1 の発現抑制により、Akt のリン酸化および PKA のリン酸化を受ける基質の発現が低下していることを確認した。
8. CXCR4 経路が寄与しているかどうかを調べる目的で、SBC5 細胞の vector 細胞と CADM1 発現細胞の CXCR4 をノックダウンし、コロニー形成能を評価したところ、CADM1 発現細胞においてのみ、CXCR4 の発現抑制によりコロニー形成能が抑制する傾向が得られた。また SBC5 細胞のヌードマウスにおける皮下腫瘍移植を用いて、CXCR4 阻害剤である AMD3100 を投与したところ、CADM1 発現細胞においてのみ、薬剤の添加により腫瘍増殖能が抑制された。また SBC5 細胞では CADM1 の発現により Akt のリン酸化が亢進するが、CXCR4 の発現抑制により Akt のリン酸化が抑制された。以上のことから、CADM1 は CXCR4 を介して SCLC の足場非依存的な増殖および皮下腫瘍増殖を促進することが示唆された。

以上、CADM1 は SCLC の増殖・転移を促進し、その分子機構として CADM1 はアクチン結合タンパク質である 4.1R を膜にリクルートすること、および CXCR4-PI3K 経路を活性化することを介することが示唆された。本研究は CADM1 の SCLC の新規治療法への応用が期待される内容であり、よって本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1978 字