

博士論文

論文題目「細胞接着分子 **CADM1** によるゲフィチニブ耐性
ヒト肺腺がんの耐性克服に向けた実験的治療」

氏名 土屋 武弘

「細胞接着分子 CADM1 によるゲフィチニブ耐性
ヒト肺腺がんの耐性克服に向けた実験的治療」

土屋 武弘

「細胞接着分子 CADM1 によるゲフィチニブ耐性
ヒト肺腺がんの耐性克服に向けた実験的治療」

東京大学大学院博士課程

医学系研究科外科学専攻呼吸器外科分野

指導教員 中島 淳 教授

土屋 武弘

目次

	頁
要旨-----	1
序文-----	2
方法-----	29
結果-----	40
考察-----	65
結論-----	77
謝辭-----	78
参考文献-----	79

要旨

上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR 阻害剤) は、EGFR 遺伝子変異を持つ症例で著明な抗腫瘍効果を発揮する。しかしながら、耐性獲得による再発が臨床上大きな課題であり、その解決が望まれる。

獲得耐性の原因の一つは、*MET* 遺伝子の増幅である。接着因子 *CADM1* は、*MET* に対して抑制的に作用する分子である。本研究では、*MET* 増幅により耐性を獲得した肺腺がん細胞が、*Cadm1* 遺伝子の導入によって EGFR 阻害剤への感受性を回復することを培養細胞・動物個体レベルで明らかとした。特に、アデノウイルスベクターによる *CADM1* 導入法は、耐性克服を目標とした新規遺伝子治療に繋がる可能性をもつと考えている。

序文

世界および日本において、肺がんは特に高い罹患率・死亡率を有する悪性腫瘍である [1,2]。本邦での部位別がん死亡数統計によれば、肺がんによる死亡者数は、全がん死中、男性で第1位、女性で第2位である。また日本人が生涯のうちに肺がんになる割合は男性で7.4%、女性で3.1%となっている [3]。非喫煙者相比于、喫煙者が肺がんになるリスクは男性で4.4倍、女性で2.8倍と高い [4]。肺がんは約80-85%を占める非小細胞肺がん (NSCLC; Non-Small Cell Lung Cancer)、約15-20%を占める小細胞肺がん (SCLC; Small Cell Lung Cancer)に大別され、更に非小細胞肺がんは、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんに分類される。非小細胞肺がんの中では腺がんが最も多く、全体の50-60%を占める [5,6]。

肺がんに対する治療方法は、肺がんの分類 (非小細胞肺がん、小細胞肺がん) と病期に基づいて、全身状態 (PS; Performance Status)、年齢、合併症等の耐術能を考慮して総合的に判断し選択される。病期Ⅰ、Ⅱ期においては耐術能に問題がなければ、手術療法が選択される。そして手術後の病期に応じて、術後化学療法が追加されることもある。ⅢA、ⅢB期となると化学療法、放射線療法が、Ⅳ期では化学療法が選択される。手術不能症例においては、がん遺伝子を標的とした分子標的薬が用いられるようになっている (表1、2; 肺がん取扱い規約第7版) [7]。

表 1 :肺がんにおける T N M分類[文献 7]

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
T1	腫瘍最大径 $\leq 3\text{cm}$ 、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(主気管支に及んでいない)
T1a	腫瘍最大径 $\leq 2\text{cm}$
T2a	腫瘍最大径 $> 2\text{cm}$ でかつ $\leq 3\text{cm}$
T2	腫瘍最大径 $> 3\text{cm}$ でかつ $\leq 7\text{cm}$ 、または腫瘍最大径 $\leq 3\text{cm}$ 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$\geq 2\text{cm}$ 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 $> 3\text{cm}$ でかつ $\leq 5\text{cm}$ 、あるいは $\leq 3\text{cm}$ で胸膜浸潤あり(PL1、PL2、葉間の場合はPL3)
T2b	腫瘍最大径 $> 5\text{cm}$ でかつ $\leq 7\text{cm}$
T3	最大径 $> 7\text{cm}$ 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 2cm 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	遠隔転移あり
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あり

表 2 :肺癌病期分類 [文献 7]

潜伏癌	TX	N0	M0
0 期	Tis	N0	M0
I A 期	T1a または T1b	N0	M0
I B 期	T2a	N0	M0
II A 期	T1a または T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
II B 期	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
III A 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
III B 期	Any T	N3	M0
	T4	N2	M0
IV 期	Any T	Any N	M1a または M1b

ここで、がんの成因について述べる。肺がんを含む悪性腫瘍は、遺伝子の異常が経時的・多段階的に蓄積することによって生じると考えられている。特にがんの発生・進展に関わる遺伝子異常の中で、増殖・転移・浸潤の直接的な原因となる遺伝子変異を ”driver mutation” と呼ぶ。このような変異をもつ遺伝子の中で、増殖促進を担い、変異の獲得により発がんを誘導する遺伝子を ”がん遺伝子” と呼んでいる。一方で、がん化を抑制し、遺伝子変異や欠失等によって機能欠損が生じ、その結果としてがんの進展に関与する遺伝子を ”がん抑制遺伝子” と呼ぶ。肺腺がんの成因に関わるがん遺伝子として *EGFR*、*KRAS*、*MET*、*ALK-EML4* などが [8,9]、またがん抑制遺伝子として *TP53*、*CADMI* など [10-13] が報告されている。

近年、この遺伝子を標的とした分子標的薬が臨床に広く用いられるようになり、治療選択は大きく変化した。その中で、上述した *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor; 上皮成長因子受容体) のチロシンキナーゼ阻害剤 (*EGFR-TKI*) はゲフィチニブ、エルロチニブとして広く用いられている。

ここで、*EGFR* について説明する。*EGFR* は c-ErbB (以下 ErbB) family に属しており ErbB1 とも呼ばれる。ErbB family は、*EGFR /ErbB1 /HER1*、*ErbB2 /Neu /HER2*、*ErbB3 /HER3* と *ErbB4 /HER4* の 4 遺伝子から構成される。

EGFR の構造は 3 つの領域からなる。増殖因子等が結合する細胞外領域、細胞

膜を貫通する疎水性膜貫領域、チロシンキナーゼ活性をもつ細胞内領域である。さらに細胞内領域は膜近傍領域、キナーゼ活性領域、C末端領域の3つに分けられる。リガンドとして、EGF、TNF- α 、HB-EGF等が報告されており、リガンドが結合することで、EGFR同士によるホモ二量体 (homo dimer)、あるいは他のErbB family とのヘテロ 2 量体 (hetero dimer)が形成され、活性化される。EGFRには複数のチロシン残基が存在するが、これらのチロシンをEGFR自身がリン酸化する (自己リン酸化)。更に、それぞれのリン酸化部位に特異的なアダプタータンパク (Grb2, Sos, SHC, PLC γ , p85 等)が結合し、下流のRas/Raf/MEK経路、Jak/STAT経路、PI3K/Akt経路を活性化することで細胞の増殖、生存を正に制御している (図1) [14-19]。

悪性腫瘍で認められるEGFRの異常には、過剰発現、細胞外領域の欠損、細胞内領域の点突然変異や欠失がある。EGFRは肺がんや乳がんを始めとする、多くの癌腫でdriver mutationとして機能し、がんの発生や悪性化に関わっている。従って、EGFRを標的とした多くの分子標的薬が開発・上市され、臨床で使用されている。

なかでも、2002年、世界に先駆けて日本で薬事承認されたEGFR-TKIがゲフィチニブである。当初は「手術不能または再発非小細胞肺がん」が適用症例であったが、その効果には疑問が呈されていた。しかし、2004年LynchやPaez等

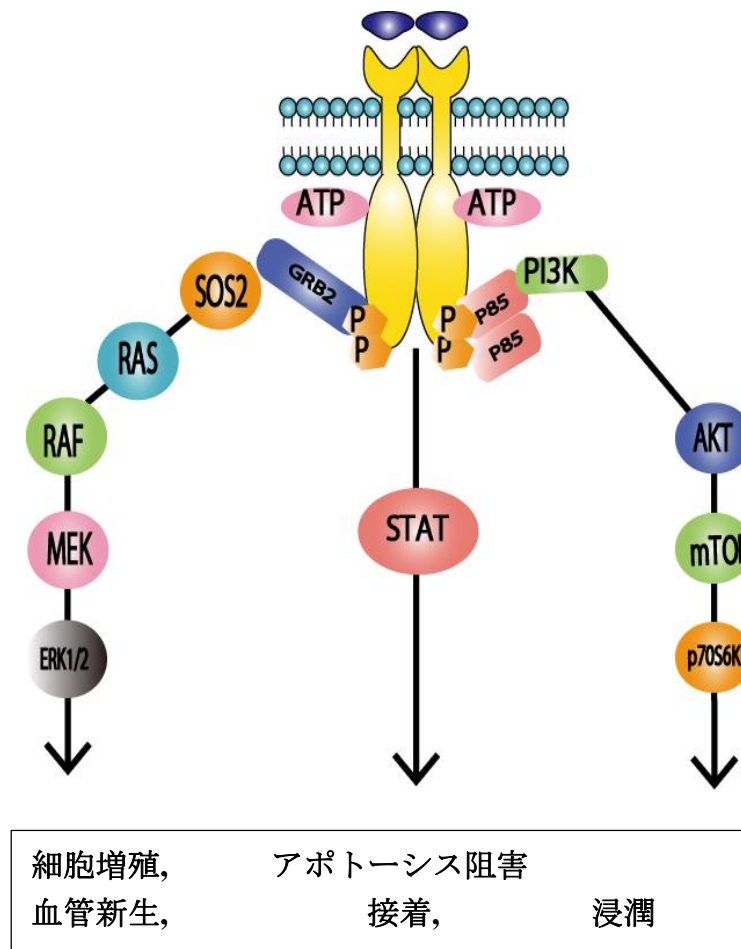


図 1 : 上皮成長因子受容体 (EGFR) のシグナル伝達経路

EGFR は ErbB ファミリーに属している、一回膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼである。EGF、TNF- α 、HB-EGF 等のリガンドが結合することで、EGFR 同士によるホモ二量体 (homo dimer)、あるいは他の ErbB family とのヘテロ 2 量体 (hetero dimer) が形成され、活性化される。それぞれのリン酸化部位に特異的なアダプタータンパク (Grb2, Sos, SHC, PLC γ , p85 等) が結合し、下流の Ras /Raf /MEK 経路、Jak /STAT 経路、PI3K /Akt 経路を活性化することで細胞の増殖、生存を正に制御している [13-18 より改変して引用]。

により衝撃的な報告がなされた。EGFR のエクソン 19 内の 5 アミノ酸の欠失 (del1746-750) 或いはエクソン 20 の 858 番目のロイシンの点突然変異 (L858R) を有する症例には、ゲフィチニブが著効するとの結果が得られたのである [20, 21]。これらの変異は EGFR の ATP 結合領域に存在し、リガンド非依存的な二量体形成とそれに伴う恒常的な活性化が生じる (図 2-A)。結果として、下流シグナルの自律的な活性化が引き起され、発がんが誘導される。ゲフィチニブは、この変異型 EGFR に対して特に高い親和性を示し、ATP と競合的に結合することでリン酸化を阻害し、下流シグナルを遮断、増殖抑制やアポトーシスを誘導する (図 2-B)。

その後発表された複数の第 III 相試験 (IPASS 試験、First-Signal 試験等) から、EGFR 活性型変異を有する肺癌に対する無増悪生存期間 (PFS) の延長が証明され、ゲフィチニブの優越性が明確に示されることとなった [22,23]。具体的には、非小細胞肺癌において、EGFR 変異の有無で EGFR-TKI による奏効率を検討した試験では、EGFR 変異のある非小細胞肺癌 1335 例中で奏効率 72% (377 例/522 例)、変異のないものでは 10% (80 例/809 例)であった [24,25]。また、活性型 EGFR 変異を有する肺癌に対しては、進行性のがんであっても生存期間中央値はおよそ 30 ヶ月と、通常の生存期間中央値 (12 ヶ月)に比べ、大幅な延長が認められた。

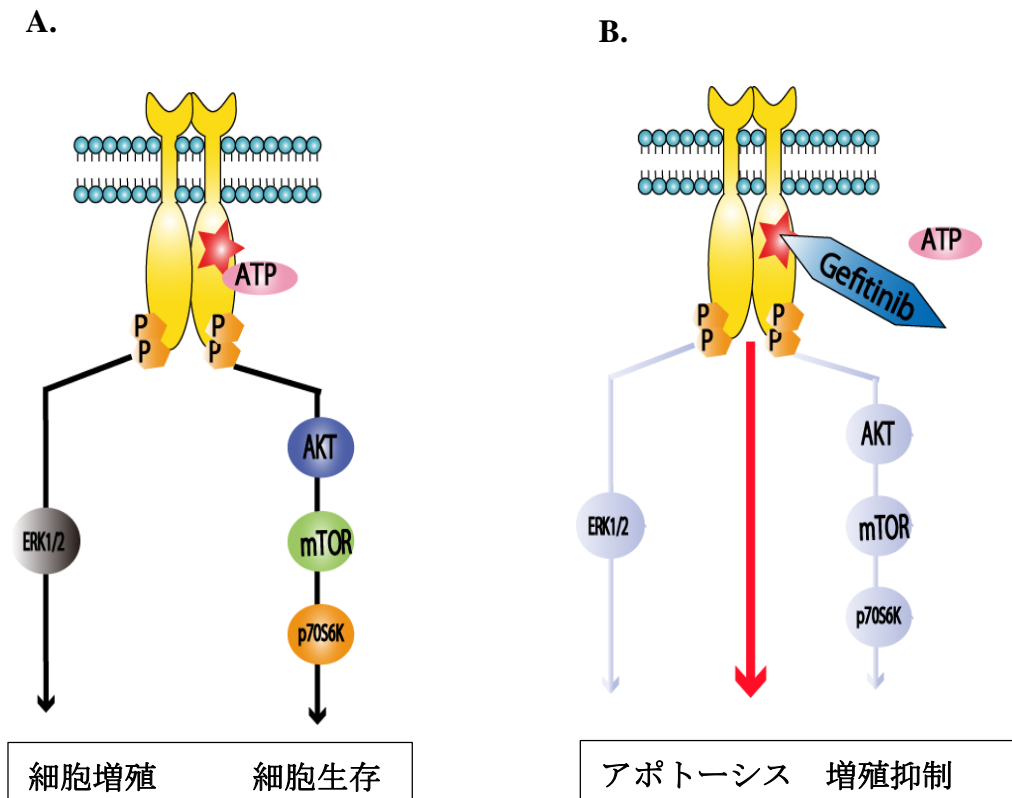


図 2:変異型 *EGFR* によるシグナル伝達機構とゲフィチニブ作用機序

- (A) *EGFR* のチロシンキナーゼ部位に活性型変異が生じることにより、EGF・TGF- α 等のリガンドが結合しない状態であっても、Ras/Raf/MEK 経路、PI3K/Akt 経路を自律的に活性化して細胞の増殖、生存を促しがん化にいたる。
- (B) ゲフィチニブは ATP 結合部位と競合的に結合することにより、リン酸化を阻害し、下流シグナルを遮断する。その結果、増殖抑制やアポトーシスが誘導される。

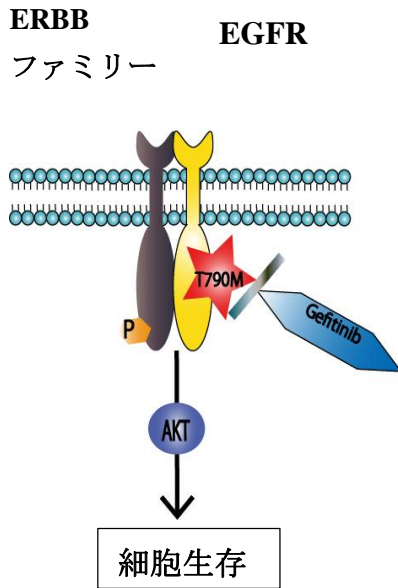
また変異の種類によっても EGFR-TKI の有効性は異なる。初期の検討をまとめてみると、エクソン 19 の欠失変異 (del746-750)の奏効率は 81%であるのに対して、エクソン 20 の点突然変異 (L858R)は 71%であり、G719X は 56%である [26]。

このようにゲフィチニブは臨床において、非常に有効な分子標的薬である。しかしほとんどの症例において、ゲフィチニブ使用後約 1-2 年で耐性を獲得し、再発を来す。临床上の大きな問題となっており、その解決が望まれている [27,28]。

耐性獲得機構として、以下のものが報告されている。

1) *EGFR* 二次的遺伝子変異 :*EGFR* の 790 番目のスレオニンがメチオニンに変異することで (T790M)、ATP 結合部位に構造的変化が生じてゲフィチニブへの親和性が低下する (図 3-A) [29]、 2) *MET* 遺伝子増幅 :過剰発現した *MET* が ErbB3 蛋白質 (ERBB3)と会合し、ERRB3 を持続的にリン酸化するバイパス経路が生じる。*EGFR* と ERBB3 がヘテロ二量体を形成する状況下で、ゲフィチニブが *EGFR* 活性を抑制しても、ERRB3 を介して下流シグナルが活性化され、がん細胞の増殖・生存シグナルが維持される (図 3-B) [30]、 3) HGF 過剰発現 :*MET* のリガンドである肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor :HGF)が過剰発現することで、*MET* 経路が活性化される、 4)上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition :EMT) :EMT 誘導による上皮性形質の消失により薬剤感受

A.



B.

MET 増幅

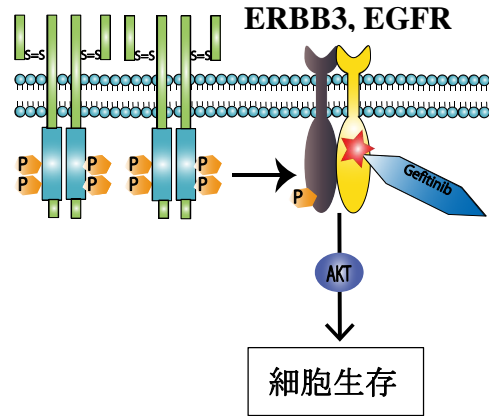


図 3 :ゲフィチニブに対する耐性獲得機構

- (A) *EGFR-T790M* :*EGFR* に二次性変化が生じることで ATP 結合部位が構造的に変化する。そのことにより、ゲフィチニブとの結合親和性が低下し細胞の生存シグナルが維持される。
- (B) 過剰発現した MET が ErbB3 蛋白質 (ERBB3) と会合し、ERBB3 を持続的に活性化するバイパス経路が生じる。EGFR と ERBB3 が二量体を形成する状態において、ゲフィチニブが EGFR 活性を抑制しても、ERBB3 を介して下流シグナルが活性化され、がん細胞の増殖・生存シグナルが維持される

性の低下・消失する。また、肺腺がん細胞から小細胞肺がん細胞への形質転換も報告されている、5) *PIK3CA* 変異 : *PIK3CA* に変異が生じ、恒常的な PI3K 経路の活性化が起こる [27]。これらの要因のうち、肺腺がんでは、ゲフィチニブ獲得耐性の 5-22% が *MET* 遺伝子増幅に起因している [27-30]。 *MET* は膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼであり、種々のがん組織でその変異や過剰発現が認められるがん遺伝子である。 *MET* タンパク質は α 鎖と β 鎖からなり、 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もち、その β 鎖に細胞外ドメインの α 鎖が結合したヘテロダイマー構造をとる。 HGF をリガンドとして、リガンドが結合することで細胞内領域に存在する複数のリン酸化部位が自己リン酸化される。 *MET* の自己リン酸化部位は Tyr1003 と Tyr1234 /1235 である。 Tyr1003 と Tyr1234/1235 は c-Cbl を介したユビキチン化と *MET* の分解に、更に Tyr1234 /1235 はアダプタータンパク (Gab1、Grb2、ShC、c-Cbl) など様々な分子群の結合を促し、 PI3 kinase、 PLC- γ 、 STATS、 ERK などのシグナルを活性化する。その結果、細胞周期を進行させ、細胞増殖を促進する。また、血管新生や細胞運動の亢進に関わり、がん細胞の浸潤・転移に大きな役割を果たしている。(図 4) [31-33]。

次に、村上らにより同定されたがん抑制遺伝子 *CADMI* (*Cell Adhesion Molecule*

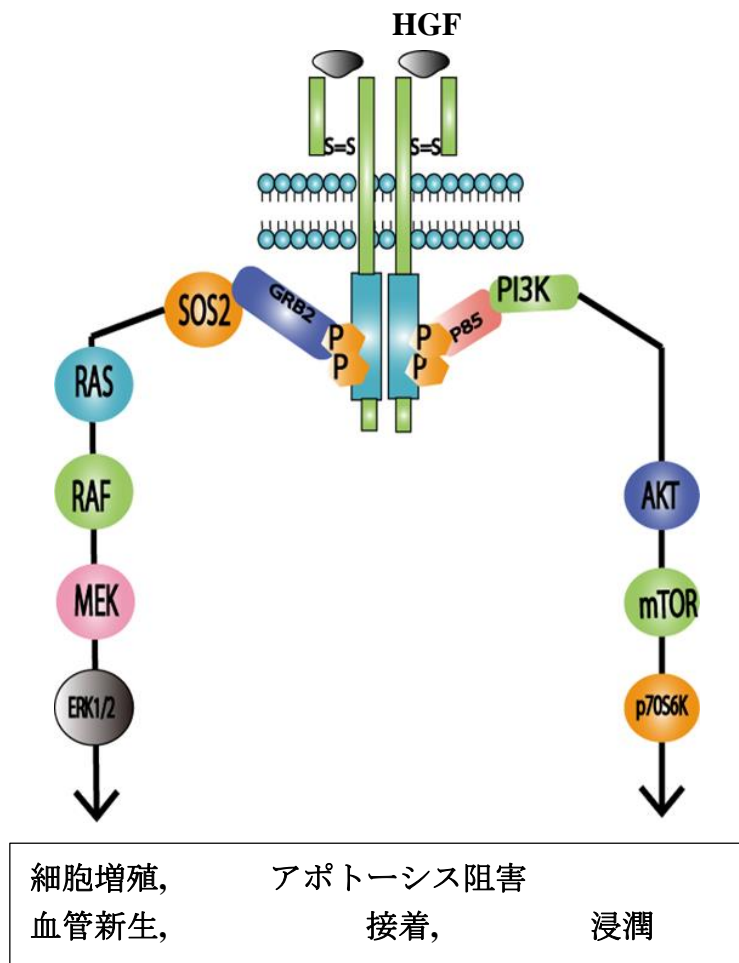
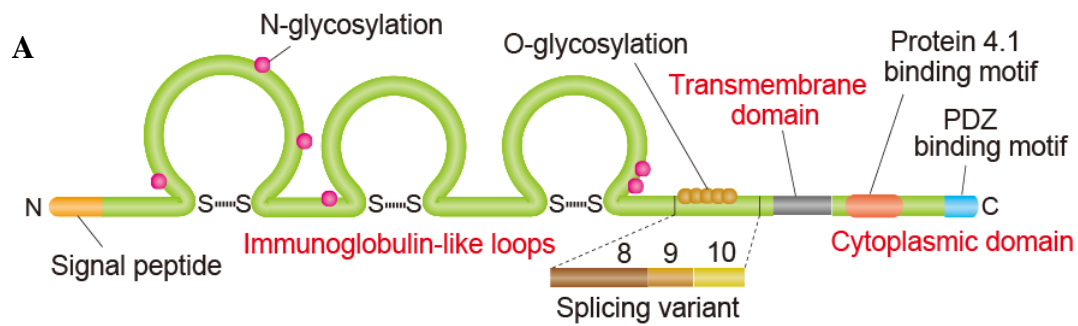


図 4 :受容体型チロシンキナーゼ MET とシグナル伝達

膜貫通型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 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に関与する。

I)について述べる。CADM1 は、ヒト非小細胞肺癌株 A549 の造腫瘍性を指標として機能的相補法により、2001 年に単離・同定された [13]。CADM1 は細胞外領域に V 型、C2 型、C2 型の 3 つの免疫グロブリン様ループをもち、膜貫通領域、細胞内領域で構成される一回膜貫通型の糖タンパク質である。細胞内領域は 4.1 タンパク結合ドメインと PDZ 結合ドメインから構成される。上皮細胞の側細胞膜に局在して他の CADM1 と cis 結合によりホモ二量体を形成する。そして、隣接細胞の CADM1 分子と細胞外ドメインを介して trans 結合することで上皮細胞における接着に関与する [34,35]。細胞内領域における 4.1 タンパク結合ドメインには、アクチン結合性足場タンパク質 4.1B/DAL-1 が結合して、PDZ 結合ドメインには細胞極性に関与する膜結合性グアニル酸キナーゼ (MAGuKs) 分子群に属する MPP3、CASK、Pals2、syntenin 等や非受容体型チロシン脱リン酸化酵素 PTPN13 が結合することが報告されている (図 5) [36]。

CADM1 は、ほぼ全ての上皮組織に発現しており、特に肺、脳、精巣において強い発現が認められる [13]。一方で、肺をはじめとする様々な組織由来のがんにおいて、その進展に伴って発現が低下・消失する。特に肺腺がんでは約 60% の症例で、CADM1 の発現低下または消失が見られ、その原因としてアレルの欠失、プロモーターのメチル化などが報告されている [37-39]。



B

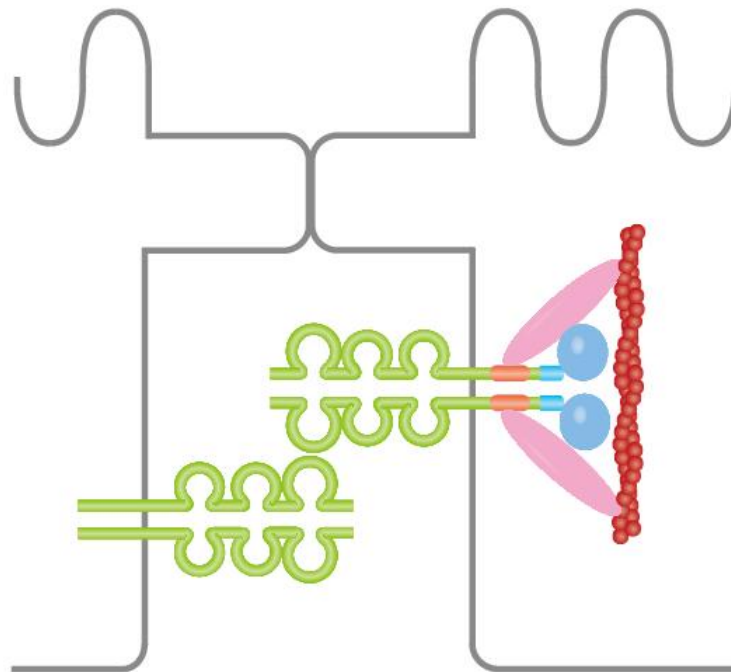
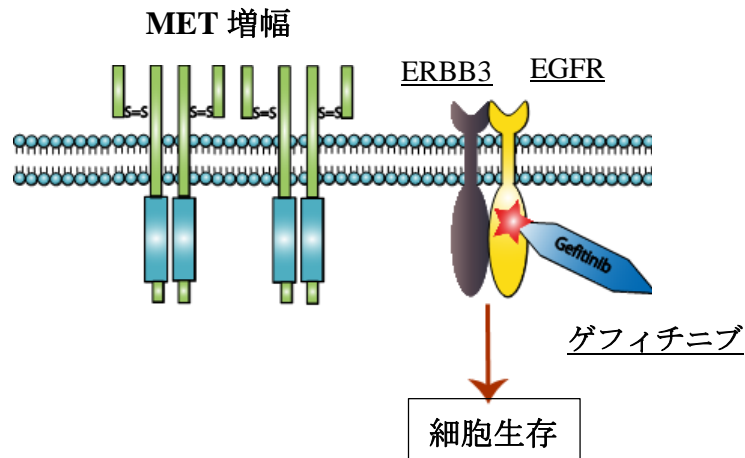


図 5 :細胞接着分子 CADM1 の構造と機能

(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 は上皮細胞において細胞膜側面に発現し、別の CADM1 とホモ二量体を形成する。そして、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。

A.



B.

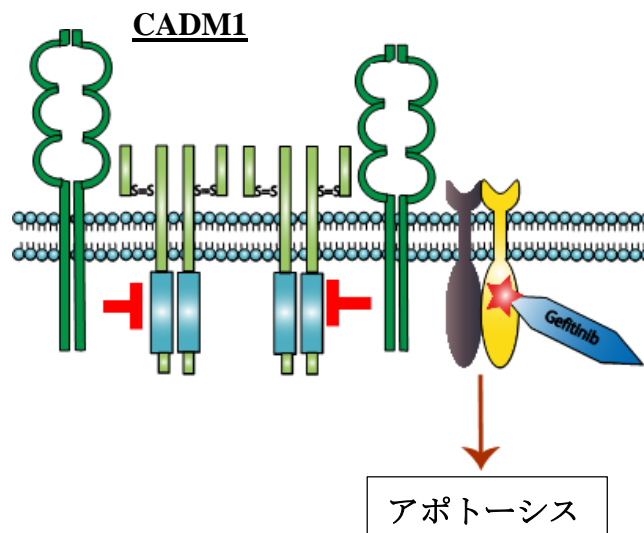


図 6:

MET 増幅によるゲフィチニブ耐性獲得機構と CADM1 導入による影響

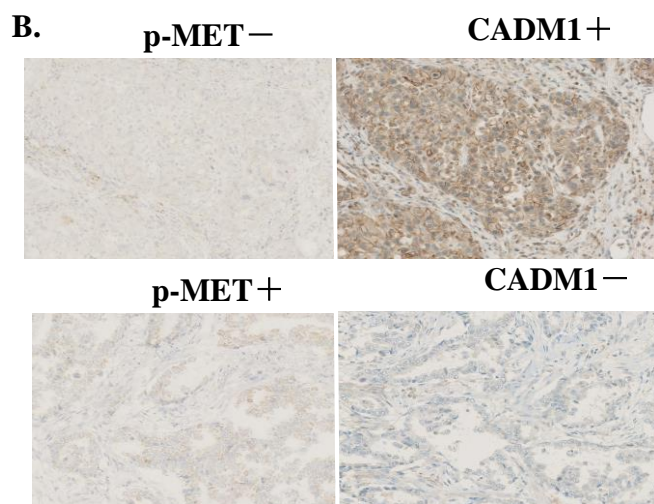
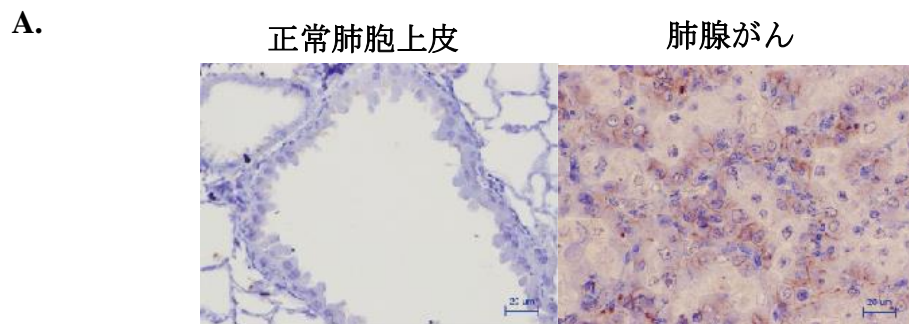
(A) ERBB3 と EGFR が二量体を形成する。MET 遺伝子が増幅することにより、EGFR 非依存的に ERBB3 を活性化することで、ERBB3 を介し生存シグナルを伝達し耐性を獲得する。

(B) CADM1 を外来性に導入することで、MET に対して抑制的に働き、ゲフィチニブに対する感受性を改善する可能性がある。

近年、我々は、CADM1 が HGF-MET 経路に対して抑制的に働く可能性を見出した (図 6)。第一に、イヌ腎尿細管上皮細胞 MDCK 細胞において、HGF 刺激による EMT を CADM1 が抑制すること [40]。第二に、*Cadm1* 遺伝子欠損マウスに自然発生した肺腺がんの 44% で、MET のリン酸化亢進が認められること、(図 7-A) [41]、第三に、ヒト肺腺がん検体に対する免疫組織染色による解析から、CADM1 とリン酸化 MET の発現が逆相関することが明らかとなった (図 7-B)。

そこで桑野、室井らは、*EGFR* 変異 (del1746-750) を有する、ゲフィチニブ感受性肺腺がん細胞株 HCC827 細胞と、MET 増幅により耐性を獲得した HCC827GR5 及び HCC827GR6 (以下 GR5 および GR6 細胞) をモデルとして、耐性獲得における CADM1 と MET の関連性を検討した。

その結果、1) 親株と異なり、耐性株 GR5 および GR6 細胞 では CADM1 の発現が認められないこと (図 8-A, B)、2) CADM1 発現細胞では CADM1 と MET が複合体を形成すること (図 8-C)、3) GR5 に CADM1 を強制発現させることで、MET のリン酸化と下流因子である Erk の活性が抑制され、ゲフィチニブに対する感受性が部分的に回復すること、が明らかとなった (図 9、図 10) [42]。更に、CADM1 によるゲフィチニブ感受性の回復には、細胞外ドメインの免疫グロブリン様ループ領域が必要であり、また CADM1 の細胞内領域に関しては、PDZ 結合ドメインおよび 4.1 タンパク質結合ドメインを含む PDZ 結合ドメイン以外



		p-MET		Total
		(+)	(-)	17
CADM1	(+)	3	8	11
	(-)	4	2	6

図7:CADM1 ノックアウトマウスとヒト肺腺がん検体における免疫染色を用いた CADM1 と p-MET の検出

(A)CADM1 ノックアウトマウスの正常肺胞上皮と肺腺がんの抗リン酸化 MET 抗体(p-MET; pTyr1234/1235)による免疫染色を行なったところ、肺腺がん細胞の細胞間接着面にリン酸化 MET(p-MET)シグナルを認めた。

(B)ヒト肺腺がん検体において、抗 CADM1 抗体と抗リン酸化 MET 抗体(p-MET; pY1234/1235)を用いて免疫染色を行なった。17 例中 11 例(64.7%)で CADM1 を検出し(CADM1+)、そのうち 8 例 (72.3%)で p-MET の欠失を認めた(p-MET-)。また 17 例中 6 例(35.3%)で CADM1 が欠失しており(CADM1-)、そのうち 4 例(66.7%)で p-MET を検出した(p-MET+)。ヒト肺腺がん検体において、CADM1 と p-MET の発現は逆相関の関係にあった。

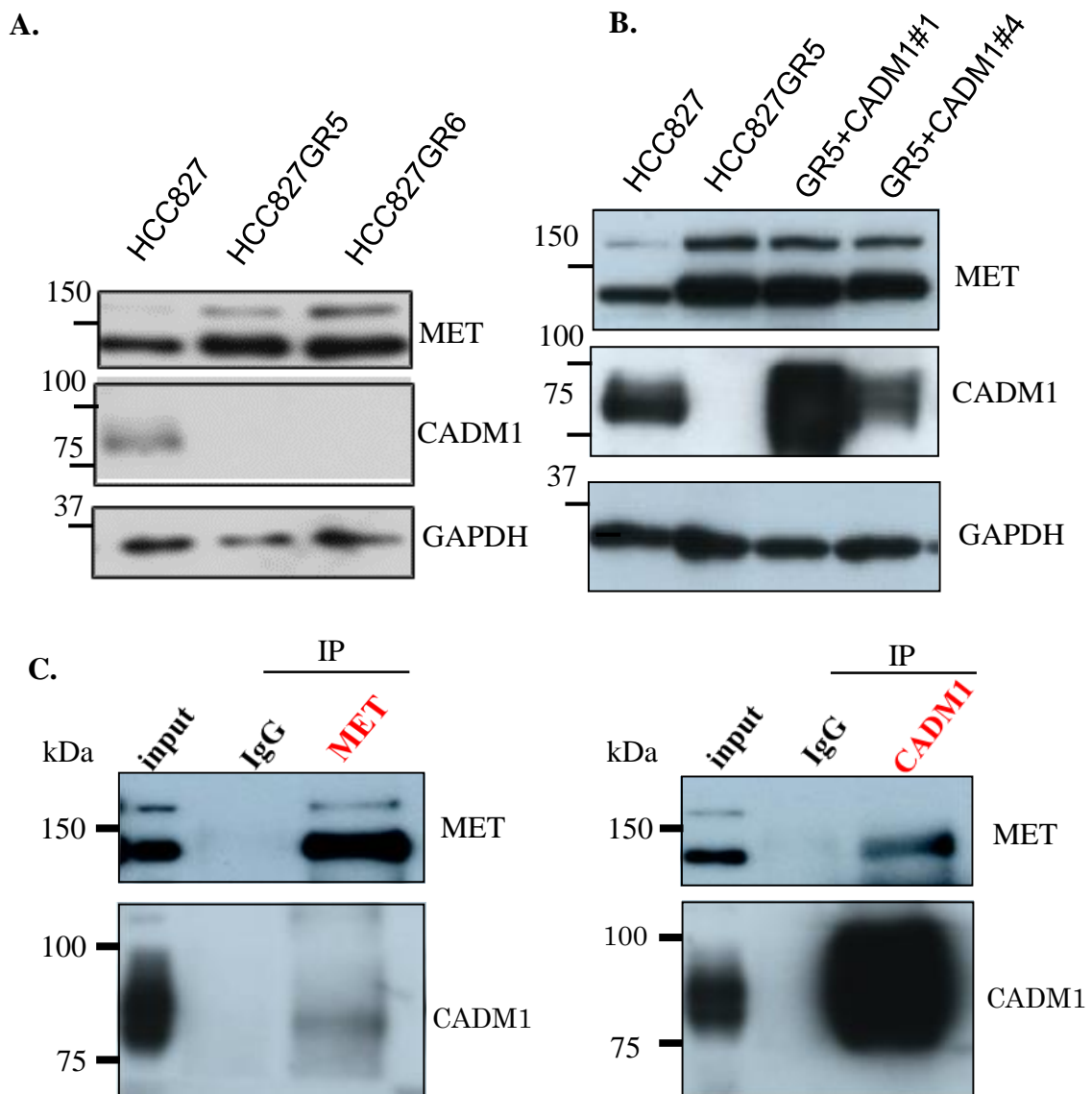


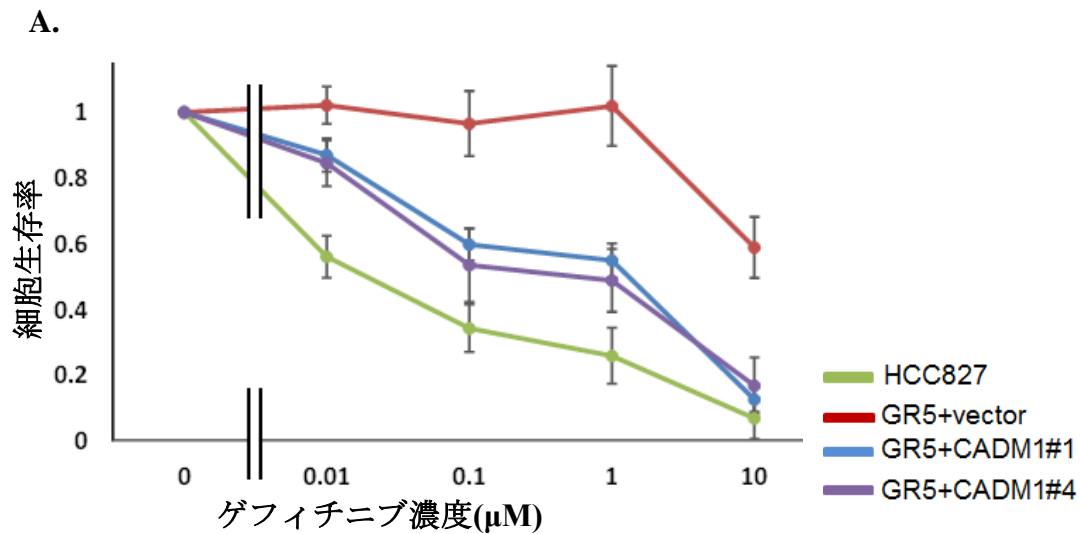
図 8 :

ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞における CADM1 の発現と MET との関係性
 (A) ゲフィチニブ感受性肺腺がん細胞 HCC827 細胞(del746-750)にゲフィチニブを 6 ヶ月間暴露させることにより、ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株 HCC827GR5、GR6 細胞株を樹立した。ウェスタンブロットで、ゲフィチニブ感受性肺腺がん細胞株 HCC827 細胞における CADM1 の発現と、耐性肺腺がん細胞株 HCC827GR5 細胞における CADM1 の発現欠如を認めた。また GR5 は親株である HCC827 と比較して MET の増幅を認めた。

(B) GR5 に CADM1 を導入して GR5+CADM1#1、#4 を樹立した。

(C) 共免疫沈降により、CADM1 と MET の複合体形成を認めた。

[文献 42 より引用]



IC50 values	
HCC827	0.023 ± 0.023μM
GR5+vector	>10μM
GR5+CADM1 #1	0.503 ± 0.724μM
GR5+CADM1#4	0.925 ± 0.943μM

図 9:ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株 GR5 に対して、CADM1 導入によるゲフィチニブ感受性に対する影響

HCC827 細胞、GR5 細胞、GR5+CADM1#1 を用いて、ゲフィチニブへの感受性を MTT アッセイで確認した。96 ウェルプレートに 1×10^4 細胞/ウェルの細胞を播種して、ゲフィチニブを各々投与した。投与濃度は 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 5, 10μMとした。その後、72 時間暴露させた後に吸光度を測定した。

表 3:

ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株 HCC827GR5 細胞はゲフィチニブ耐性であった($IC_{50} > 10 \mu M$)。耐性株に CADM1 を導入した HCC827GR5/CADM1#1 と CADM1#4 では表のように IC_{50} の減少を認め、ゲフィチニブに対する感受性改善が示唆された。

[文献 42 より引用]

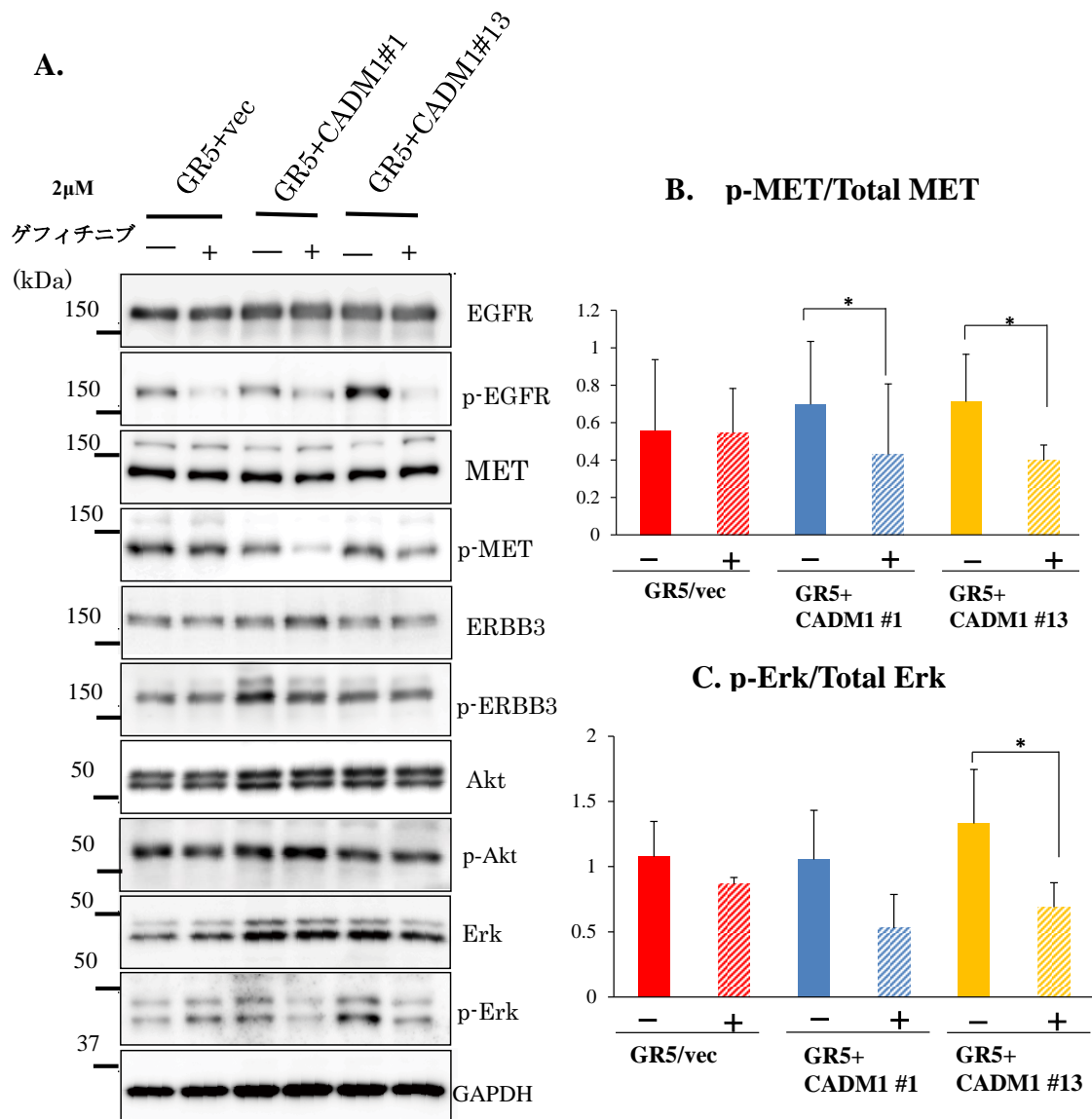


図 10 :MET シグナル経路に対する、CADM1 とゲフィチニブの影響

細胞播種後、ゲフィチニブ治療群と非治療群に割り当て、治療群にはゲフィチニブ 2 μ Mを投与した。その後、24 時間後に細胞を回収した。

(A)耐性肺腺がん細胞株 GR5 では治療群と非治療群でシグナルにおいて、有意な差は認められなかった。

(B,C)ウェスタンブロット解析の結果(A)を Image J ソフトを用いて定量し、CADM1 導入前後、ゲフィチニブ投与前後の各分子のリン酸化を定量化した。GR5+CADM1#1 と GR5+CADM1#13 細胞において(B)MET、(C)Erk1/2 のリン酸化活性はゲフィチニブ投与前と比較して投与後は減弱していた。一方、ベクターを単独導入した GR5+vec 細胞では(B)MET のリン酸化活性は変化なく、(C)Erk1/2 のリン酸化活性は上昇した。

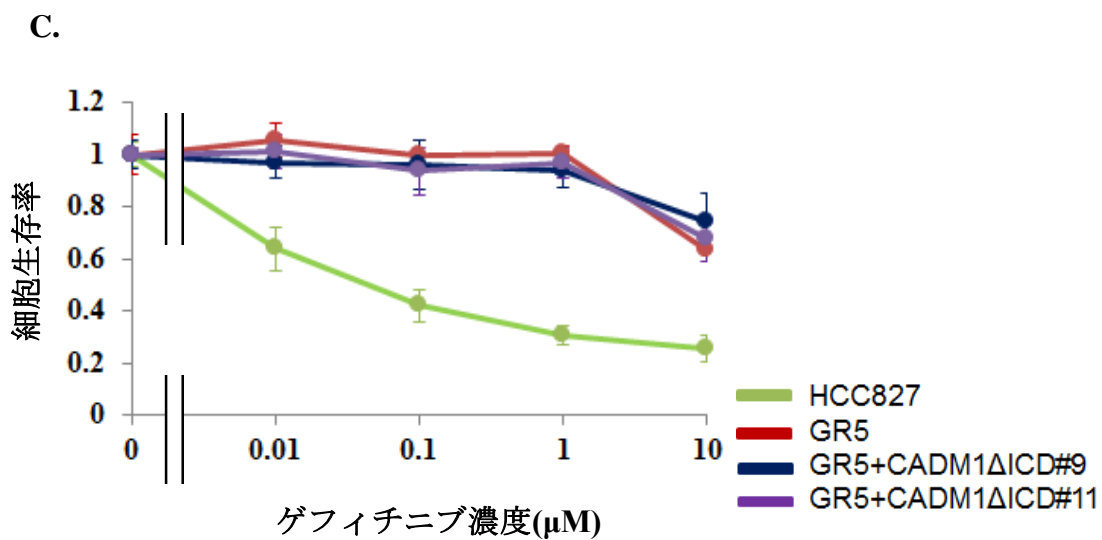
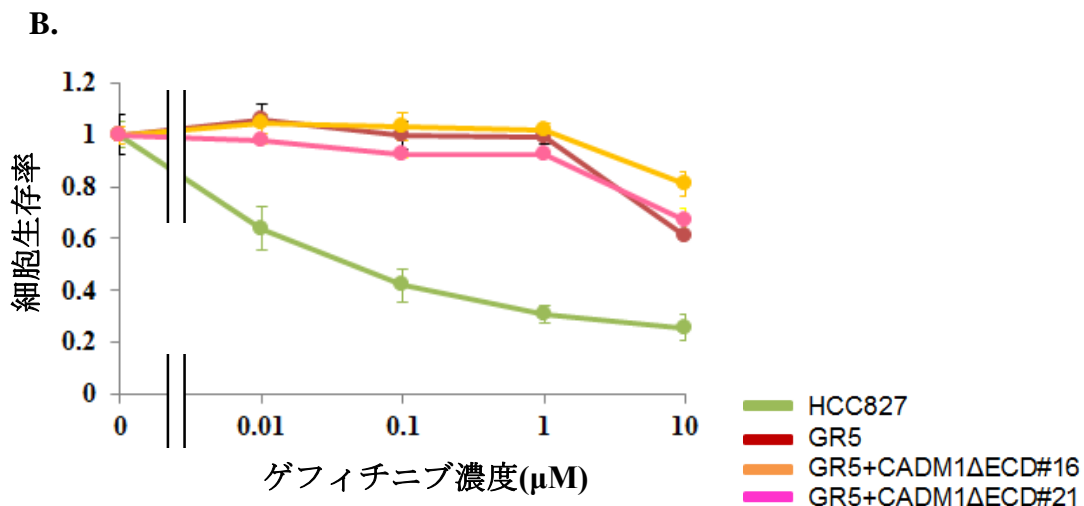
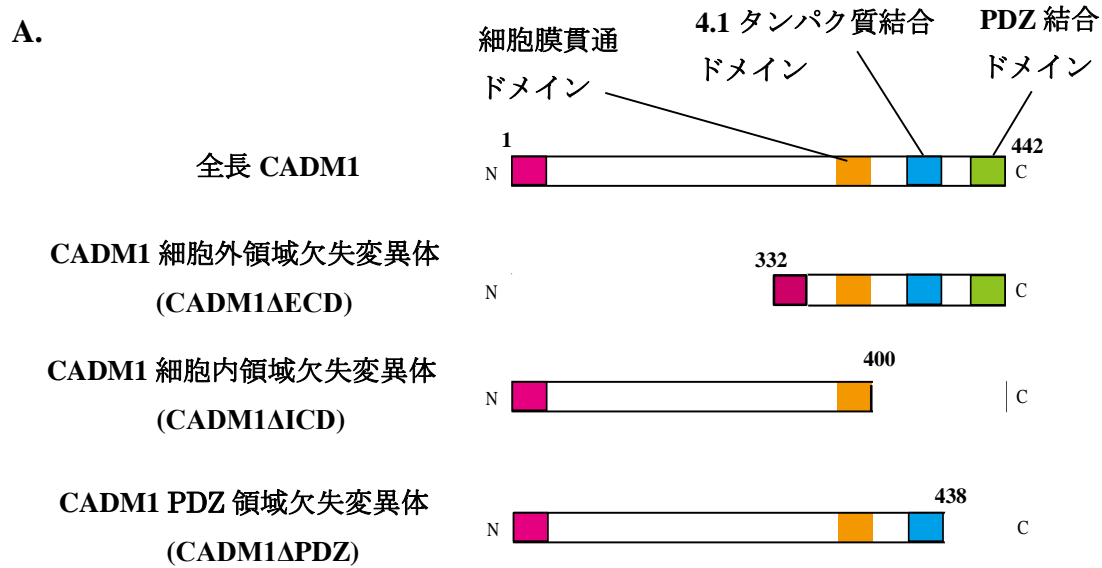
[文献 43 より引用]

の細胞内領域の両方が CADM1 の導入による HCC827GR5 細胞のゲフィチニブ感受性回復に寄与していることが示唆された (図 11)。また、GR5+CADM1 Δ ICD、GR5+CADM1 Δ ECD は両方とも、MET との相互作用が認められたが、CADM1 全長と比較して、共沈した MET タンパク質が極めて少量であった (図 12)。このことから、CADM1 の細胞外領域および細胞内領域がいずれも MET と相互作用するが、その相互作用は弱く、CADM1 と MET の安定した相互作用には両領域が必要であることが示唆された [43]。

一方で、EGFR T790M 変異を有する耐性細胞 (PC9ZD) は、CADM1 を導入してもゲフィチニブへの感受性は回復せず (図 13, 14)、CADM1 の作用は MET 過剰発現耐性株に特異的であることも明らかとなった。

以上の結果から、ゲフィチニブ耐性細胞に CADM1 を発現させることで、MET 増幅による EGFR-TKI 獲得耐性を克服しうること、更には新たな治療法の開発に繋がる可能性が想起された。

しかし上記の先行研究は、培養細胞を用いた *in vitro* での検討に過ぎない。そこで本研究においては、*in vivo* においても CADM1 導入によるゲフィチニブ感受性の回復が認められるか、担癌マウスモデルを用いて検討することとした。更に、より応用的な抗腫瘍戦略・耐性克服法として、将来的な臨床応用も見据えて、ウィルスベクターを用いた CADM1 導入による実験的な遺伝子治療モデル



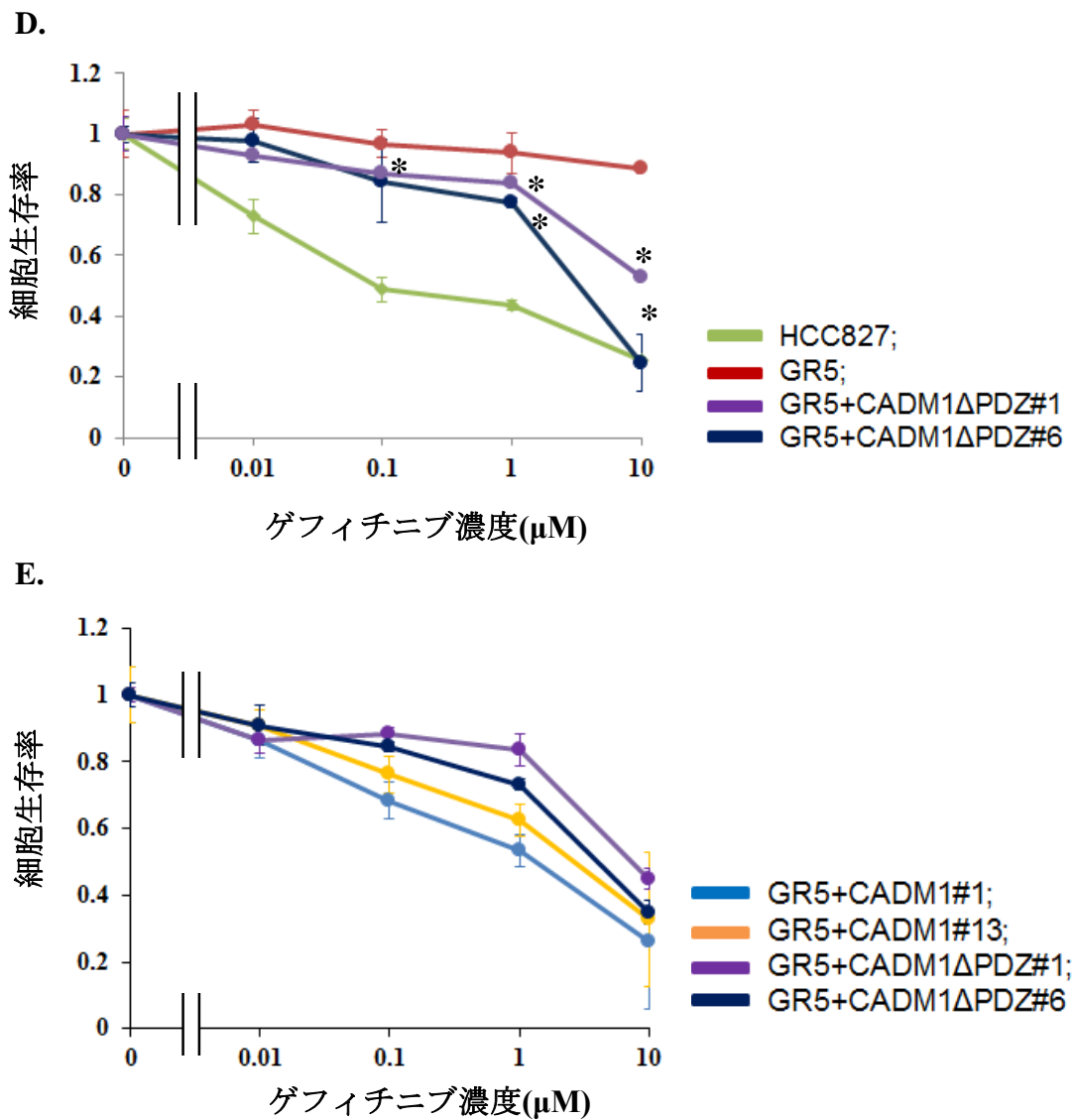


図 11 :CADM1 欠失変異体の構造とゲフィチニブ感受性の測定

(A) CADM1 および CADM1 変異体の概要図。

MTS アッセイにより、ゲフィチニブ存在下における細胞生存率を測定した。

(B)(C) GR5+CADM1 Δ ECD、CADM1 Δ ICD 細胞株は、GR5+vec 細胞と同様の生存率を示し、ゲフィチニブ感受性の回復を示さなかった。

(D)GR5+CADM1 Δ PDZ#1,#6 細胞は、GR5+vec 細胞と比べて有意に感受性が高かった。

(E)GR5+CADM1#1, #13 細胞は GR5+CADM1 Δ PDZ#1、#6 細胞と比べてゲフィチニブへの感受性が低かった。* ; $p < 0.05$, Student's *t* test

[文献 43 より引用]

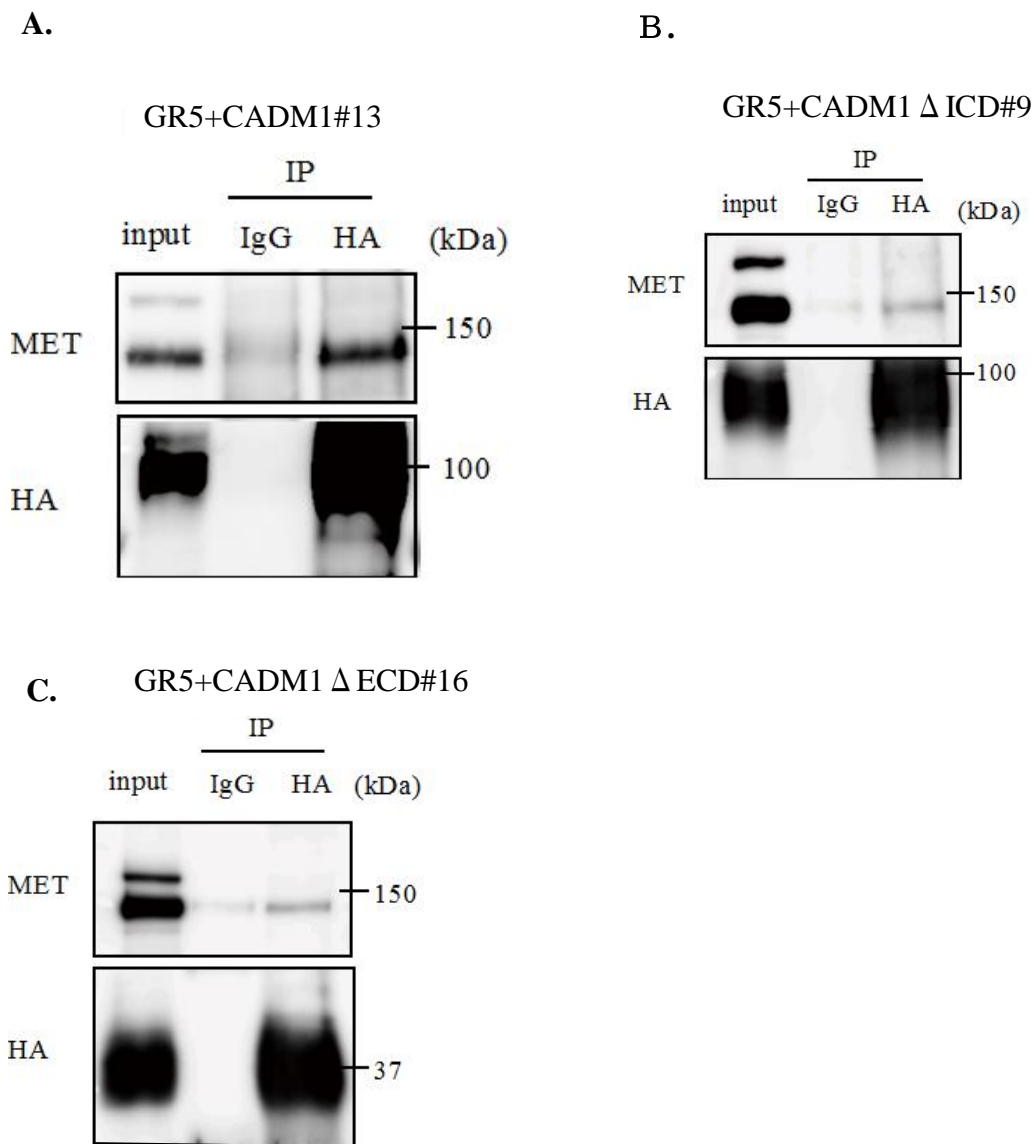
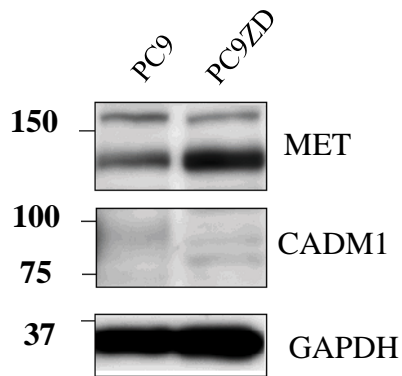


図 12 :CADM1 細胞外・細胞内領域と MET との相互作用

(A)(B)(C)MET と CADM1 全長、CADM1 Δ ICD、CADM1 Δ ECD の相互作用を調べるために、各々の遺伝子を導入した細胞のタンパク抽出液にマウス IgG、抗 HA 抗体を加えて免疫沈降した後に、抗 MET 抗体を用いて、ウェスタンブロット法を行なった。CADM1 全長、CADM1 Δ ICD、CADM1 Δ ECD すべてにおいて MET との共沈を認めたが、その量は CADM1 Δ ICD、CADM1 Δ ECD において少なかった。

[文献 43 より引用]

A.



B.

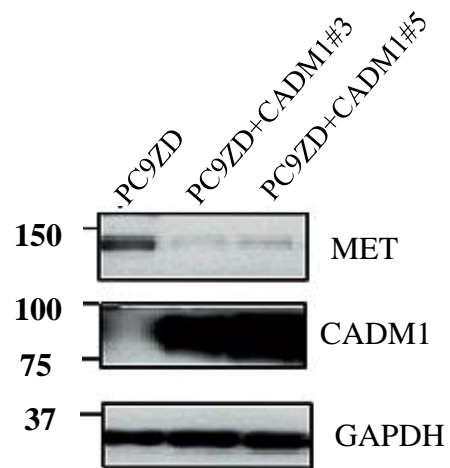
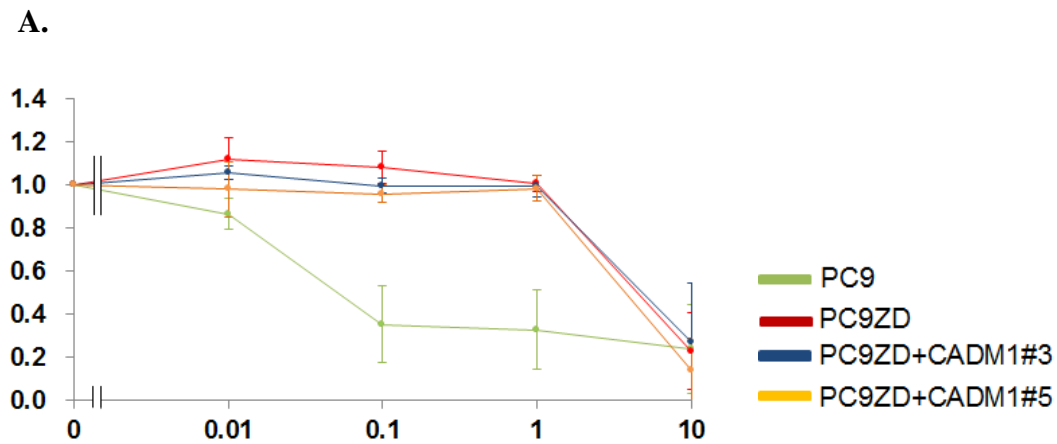


図 13 :T790M によるゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞における CADM1 の発現

(A)ゲフィチニブ感受性肺腺がん細胞 PC9 細胞 (del1746-750)にゲフィチニブを 6 ヶ月間暴露させることで、耐性肺腺がん細胞株 PC9ZD 細胞株を樹立した。

(B)ウェスタンブロットで、PC9 細胞と PC9ZD 細胞において CADM1 の発現欠如を認めた。CADM1 を導入し PC9ZD+CADM1#3、PC9ZD+CADM1#5 を樹立した。[文献 42 より引用]



Cell ines	IC50 values
PC9	0.062 ± 0.028 μM
PC9ZD	4.16 ± 1.39 μM
PC9ZD+CADM1#3	6.83 ± 5.12 μM
PC9ZD+CADM1#5	3.89 ± 0.793 μM

] n.s.] n.s.

図 14 :T790M によりゲフィチニブ耐性を獲得した肺腺がん細胞株 PC9ZD に対する CADM1 導入の影響

T790M によりゲフィチニブ耐性を獲得した肺腺がん細胞に、CADM1 を導入することで、ゲフィチニブに対して感受性を改善することが出来るのか、MTT アッセイで確認した。96 ウェルプレートに 1×10^4 細胞/ウェルの細胞を播種して、ゲフィチニブを各々投与した。投与濃度は 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 5, 10 μM とした。その後、72 時間暴露させた後に吸光度を測定した。

表 4 :PC9ZD、PC9ZDCADM1#1、PC9ZDCADM1#3 において、ゲフィチニブに対する耐性を確認した。

[文献 42 より引用]

の確立を目指した。ゲフィチニブ耐性肺腺がん腫瘍にアデノウィルスベクターにより **CADM1** を外来性に導入することで、耐性の克服が可能か否か、その投与方法も含め検討した。

方法

細胞培養

非小細胞肺癌細胞株 HCC827、HCC827GR5、HCC827GR6 (以下 GR5 及び GR6) [30]、PC9、PC9ZD [44]]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供与頂いた。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、GR5 細胞と GR6 細胞は HCC827 細胞より得られた MET 過剰発現によりゲフェチニブ耐性を獲得した細胞株である [30]。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 [44]。

HCC827 細胞と PC9 細胞は推奨されている通り、Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI1640) (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)に 10% ウシ胎児血清(FBS) (BD Biosciences, Nuaille, France)、100 units /ml ペニシリンおよび 100 µg /ml ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を添加した培地で培養した。GR5 細胞、GR6 細胞、PC9ZD 細胞は上記培養液に最終濃度 1 µM となるように Gefitinib (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz , CA, USA)を加え培養した。

GR5 細胞と PC9ZD 細胞に CADM1 を導入した GR5+CADM1 細胞と PC9ZD+CADM1 細胞と、ベクター単独細胞導入した 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

ウェ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 (Santa Cruz、CA、USA)より購入した。また Cell Signaling Technology (Beverly、MA、USA)より、AKT (C67E7)、p44 /42MAP kinase (ERK1/2) (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 /42MAP kinase (ERK1/2) (Thr202/Thr204)、およびリン酸化 MET (pY1234 /1235 (D26))抗体を購入した。抗 CADM1 /TSLC1 抗体 (C-18)は、CADM1 の C 末端 18 ペプチドを抗原として、ハプテン、keyhole limpet hemocyanin (KLH)を用いて、ウサギに対して免疫し、affinity column (MBL :Medical & Biological laboratories Co., Ltd、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 Fluoro488 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 安定発現細胞株の樹立

全長ヒト CADM1cDNA [12]は、プラスミド pBact-STneoB の制限酵素 SalI サイトに挿入し [45]、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、Carlsbad、CA、USA)を推奨条件に従って行ない、500 ng /ml G418 硫酸塩 (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)にて選択した。独立した恒常的発現株を HCC827GR5 では2クローンを得、GR5+CADM1#1 細胞、GR5+CADM1#4 細胞と名付けた。また PC9ZD 細胞では4クローンを得、PC9ZD+CADM1#1 細胞、PC9ZD+CADM1#2 細胞、PC9ZD+CADM1#3 細胞、PC9ZD+CADM1#5 細胞と名付けた。同様に、HCC827GR5 細胞に空ベクターを導入した細胞を作製し、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。

CADM1 発現誘導細胞株の樹立

全長ヒト CADM1cDNA を、プラスミド pTetOne Vector (Clontech laboratories、Inc.、Mountain View、CA、USA)の制限酵素 NotI と EcoRI サイトに挿入し、サブクローニングすることで pTet-On-CADM1 を得た。ViaFect (Promega Co.、Madison、WI、USA)で Linear Puromycin Marker と pTet-On-CADM1 を推奨条件に従って

HCC827GR5 細胞にトランスフェクションし、10 µg/ml の Puromycin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)にて選択した。独立した発現誘導株を GR5-Tet-On-CADM1 として得た。

ウェ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% TritonX-100 /1 mM EDTA / 10 mM NaF /1 mM Na₃VO₄)にプロテアーゼ阻害剤 (200 µM AEBSF, 10µM leupeptin, 1µM pepstain 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 分間静置した後、4°Cで 10 分間 20,300g にて遠心して上清を回収した。この上清に 4×SDS loading buffer (0.25 M Tris-HCl (pH6.8), 40%glycerol, 8% SDS, 20% β-ME, 0.2% bromophenol blue)を加え、純水でタンパク質濃度を 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、各ウェスタンブロット用の試料とした。

また、免疫沈降法においては、Brij98 lysis buffer (1% Brij98, 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 pepstain A)と 0.01%β-ME を加えて溶解させ、抗 MET 抗体 (C-28)、抗 CADM1 抗体 (C-18)、抗 ERBB3 抗体 (C-17) 正常ウサギ IgG 抗体を各 0.2µg 加え、4°Cで 30 分間反応させた。また、

そして各々に protein A Sepharose6MB (GE Healthcare 社、Buckinghamshire, UK)を加えて、4℃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 Separating gel を用い、SDS-PAGE electrode buffer (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 で約 60 分間、転写した。3%スキムミルク /PBS-T 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℃で約 12 時間反応させた。二次抗体は、horse radish peroxidase 標識抗 IgG 抗体を 3%スキムミルク /PBS-T を用いて、1:2,000 の濃度で希釈して、室温で 60 分間反応させた。PBS-T で洗浄後、Pierce® Western Blotting Substrate (Thermo SCIENTIFIC)を検出した。

現像後の PVDF 膜は、Amide Black にて染色して、ローディングコントロールとして使用した。

蛍光免疫染色

15×15 mmカバーガラスに細胞を播種し、24 時間後、培地を除き、直ちに 4%ホルマリン溶液に 20 分間、固定した。PBS で 3 回洗浄後、その後、0.2% TritonX 溶液を加えて、透過処理を行なった。PBS-T で洗浄した後、1% Normal goat serum で、室温 60 分間ブロッキングを行なった。

1 次抗体は 1% 正常ヤギ血清 (NGS) /PBS を用いて下記濃度に希釈して、室温で 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 Fluoro488 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て、室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、Prolong Gold with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で包埋し、蛍光顕微鏡 Axio Observer D1 microscope (Car Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察した。

ゲフィチニブ感受性試験

細胞毒性試験は、Cell Titer96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Co., Madison, WI, USA) を用い、生細胞数を測定することで行った。同キットに含まれる 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、細胞内で還元され、組織培養液に可溶性の発色性のホルマジ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。490 nm での吸光度を調べることで、生細胞の数を定量している。96 ウェルプレートに細胞を各ウェル 1×10^4 個ずつ撒き、最終濃度が 0 μM 、0.01 μM 、0.1 μM 、1 μM 、10 μM となるようにゲフィチニブを加えた。72 時間培養後、20 μl の Cell Titer96® Aqueous One Solution Reagent を培養ウェルに加えて、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、490nm の吸光度を測定した。ゲフィチニブによる 50%阻害濃度(IC₅₀)は以下の式[46]を利用した。IC₅₀= $10^{[\log(A/B) \times (50-C)/(D-C) + \log B]}$ 、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、PC9ZD+CADM1#5 細胞の IC₅₀ に対する統計学的解析には Student's *t*-test を用いた。

異種異所性移植実験

[承認番号 ;A13-60]

BALB/c nude mouse (雌、6-8 週齢)を日本クレア社 (Tokyo, Japan)より購入した。PBS200 μl に懸濁した 1×10^7 個の細胞を背側下方に皮下注射して、腫瘍異種移植モデルを樹立した。腫瘍径は週 2 回 (アデノウイルス注射群では週 3 回)測定し

た。腫瘍体積は下記のように計算した。腫瘍体積 (mm³) = 長径 (mm) × 短径 (mm)² × 1/2。

実験は以下 3 系統の動物実験を行なった (図 15)。

a) HCC827 細胞、GR5 細胞、GR5+CADM1#1 細胞を用いて腫瘍径が 100-200 mm³ となった段階で、投与群と非投与群に無作為に割り振った。投与群はゲフィチニブを 1 回あたり 50 mg /kg body の溶解液として、非投与群は PBS を各々 50 μl として週 5 回ゾンデを用いて経胃的に投与した。治療開始後 21 日目まで腫瘍径を計測して、計測終了後 2 日以内に安楽死させた。

b) GR5-Tet-On-CADM1 細胞を用いて、腫瘍体積が 100-200 mm³ となった段階で、ドキシサイクリン投与群と非投与群に割り振って、更にゲフィチニブ投与群と非投与群の計 4 群に無作為に割り振った。ドキシサイクリン投与群はドキシサイクリン 2 mg /ml を飲水ボトル内に混入して投与した。ゲフィチニブ投与群はゲフィチニブを 1 回あたり 50 mg /kg body の溶解液として、非投与群は PBS を各々 50 μl として週 5 回ゾンデを用いて経胃的に投与した。ゲフィチニブ投与開始後 21 日目まで腫瘍径を計測して、計測終了後 2 日以内に安楽死させた。

c) GR5 細胞を用いて腫瘍体積が 100-200 mm³ となった段階で、マウスを PBS 腫

瘍内注射群、Ad-vec 腫瘍内注射群、Ad-CADM1 腫瘍内注射群に分けて、更にゲフィチニブ投与群と非投与群の計 6 群に無作為に割り振った。腫瘍内注射は第 0, 4, 7, 10 日に行なった。ゲフィチニブ投与群はゲフィチニブを 1 回あたり 50 mg/kg body の溶解液として、非投与群は PBS を各々 50 μ l として週 5 回ゾンデを用いて経胃的に投与した。治療開始後 14 日目まで腫瘍径を計測して、計測終了後 2 日以内に安楽死させた。

免疫組織化学的解析

パラフィン切片を 37°C で 30 分静置した後、キシレンに浸してパラフィンを除去し、続いてエタノールに浸してキシレンを除去し、さらに 5 分間水洗した。その後、クエン酸バッファーに浸しオートクレーブで 121°C、10 分間処理して抗原を賦活化した。緩徐に室温に戻した後、0.3% 過酸化水素水/H₂O に室温で 10 分浸すことにより、内因性のペルオキシダーゼを除去した。

次に、非特異的反応を抑えるために 2% ウシ血清アルブミン (BSA :Bovine Serum Albumin) /PBS を加えて、室温で 10 分間反応させた。

一次抗体は 2% BSA /PBS を溶媒として、抗 CADM1 抗体 (CC3) は 1:300、抗 Ki-67 抗体は 1:300 の濃度で希釈して、4°C で一晩反応させた。

二次抗体は、EnVisionTM Labelled Polymer Peroxidase (Dako) を滴下し、室温で 30 分

間反応させた。洗浄後に Liquid DAB diluted Mix Buffered Substrate (DAKO)で発色させた。最後に、ヘマトキシリンで対比染色を行ない、透徹し、マリノールを用いて封入した。

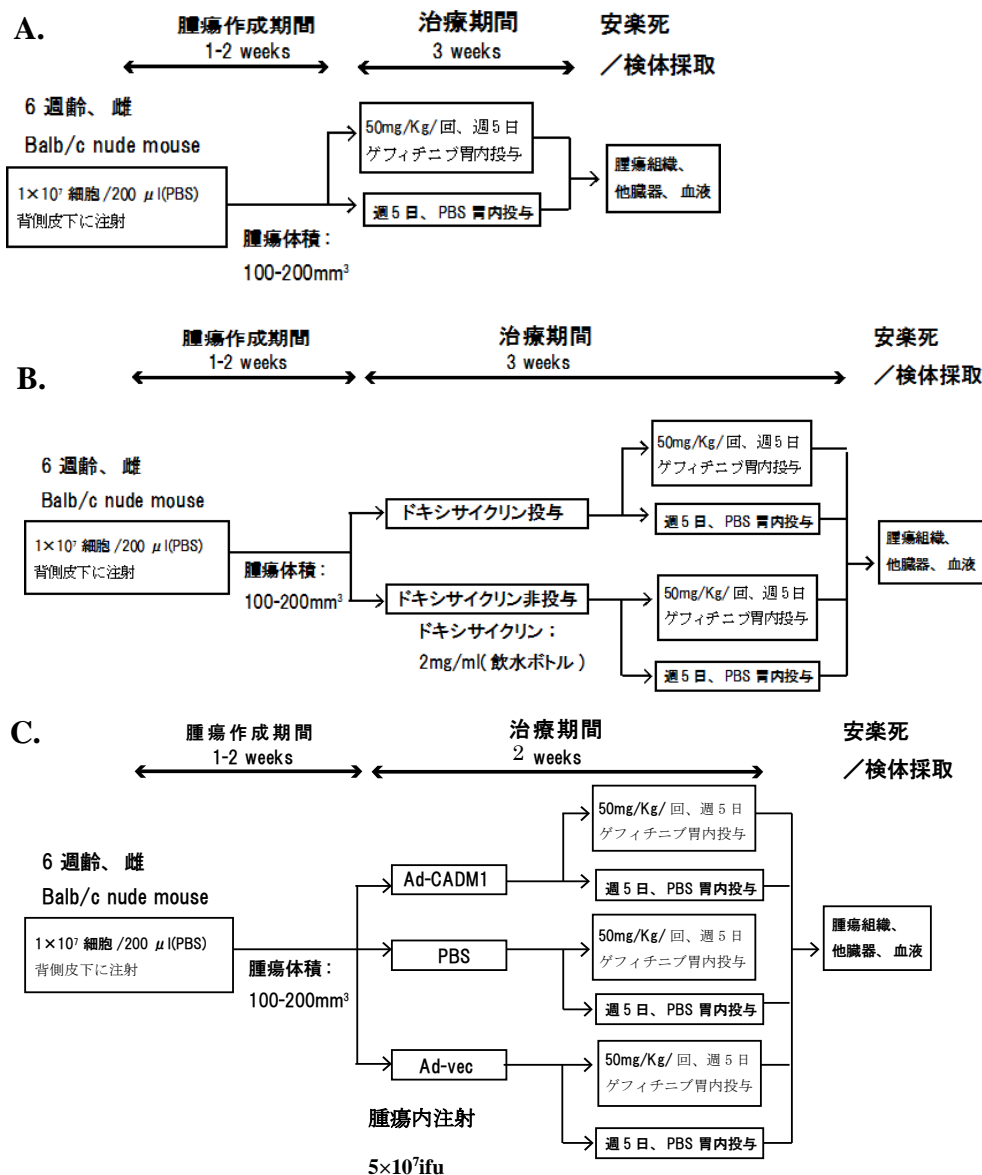


図 15: 異種異所性移植マウス治療スケジュール

- (A) HCC827、GR5、GR5+CADM1 細胞による治療スケジュール。腫瘍体積が 100-200 mm³ となった時点でゲフィチニブ、PBS を 21 日間投与開始。
- (B) CADM1 発現誘導細胞 GR5-Tet-On-CADM1 細胞を用いた治療スケジュール。腫瘍体積が 100-200 mm³ となった時点で、ドキシサイクリン投与、非投与群に割り振る。次に、ゲフィチニブ投与、非投与群に割り振り計 4 群として、21 日間治療を行う。
- (C) CADM1 発現アデノウイルス (Ad-CADM1) 腫瘍内注射を用いた治療スケジュール。腫瘍体積が 100-200 mm³ となったところで、Ad-CADM1、Ad-vec、PBS 腫瘍内注射群に分けて、更にゲフィチニブ投与・非投与群の計 6 群で 14 日間治療を行う。

結果

CADM1 は、*in vivo* においても **MET** 増幅耐性肺腺がん細胞にゲフィチニブ感受性を部分的に回復させる。

先行研究において、**MET** 増幅によりゲフィチニブ耐性を獲得した肺腺がん細胞に **CADM1** 強制発現させることで、ゲフィチニブ感受性が改善することが *in vitro* での解析から明らかとなった。

そこで *in vivo* においても同様の結果が認められるか、異種異所性移植担がんモデルマウスを用いて検討した。使用した細胞は *in vitro* と同様に、ゲフィチニブに感受性を有する **HCC827** 細胞株、**MET** 増幅により耐性を獲得した **GR5** 細胞株とゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株に **CADM1** の発現ベクターを導入した **GR5+CADM1#1** である。

異種異所性移植担がんモデルは、**Balb /c nude** マウスの背側皮下に、上記の細胞を **PBS 200 μ l** に懸濁し、 1×10^7 個移植することで作成した。細胞は皮下注射後、1-2 週間程で生着して腫瘍を形成した。腫瘍体積が **100-200 mm^3** となったところで、ゲフィチニブ投与群と非投与群に無作為に割り当てた。ゲフィチニブ投与群はゲフィチニブを 1 回あたり **50 mg /kg body** の溶解液として、非投与群は **PBS** を各々 **50 μ l** として週 5 回ゾンデを用いて経胃的に投与した。投与期間は 21 日間

として、週 2 回観察した。

本実験においては、腫瘍形成後も CADM1 の発現が維持されている必要がある。そのため、異種異所性移植担がんモデルにおいて、腫瘍移植後に HCC827 細胞と GR5+CADM1 細胞において、CADM1 の発現が維持されているか検討した。腫瘍を形成して 3 週間後に安楽死させて、抗 CADM1 抗体を用いて免疫染色を行なった。HCC827 腫瘍と GR5+CADM1 腫瘍で、CADM1 はすべての細胞において発現しており、GR5 腫瘍では CADM1 の発現は認められなかった (図 16)。

まず、ゲフィチニブ非投与群を比較する。GR5 腫瘍 (n=6)は、HCC827 腫瘍 (n=7)と比較して体積が有意に大きかった ($p=0.025$;Mann-Whitney *U* test)。それと比較して、CADM1 を導入した GR5+CADM1#1 (n=6)腫瘍は、GR5 腫瘍 (n=6)より有意に小さく ($p=0.0163$;Mann-Whitney *U* test)、HCC827 細胞による腫瘍とほぼ同様の大きさであった ($p=0.8728$) (図 17-A)。これは、CADM1 が腫瘍抑制因子としての働きを有しているためと考えられた [13]。

次に、ゲフィチニブ耐性に対する CADM1 導入効果を検討するため、ゲフィチニブ投与群の観察を行なった。まずゲフィチニブに感受性を有する HCC827 腫瘍 (n=6)では、ゲフィチニブ投与後 7 日以内に抗腫瘍効果を示して腫瘍が消退した (図 17-B, C)。

一方、ゲフィチニブに耐性を有する GR5 腫瘍は、ゲフィチニブ投与群 (n=6)

と非投与群において腫瘍体積に有意な差は認められず、ゲフィチニブによる腫瘍縮小効果は全く認められなかった($p=0.6682$;Mann-Whitney U test) (図 17-D)。

次に、GR5 細胞に CADM1 を導入した GR5+CADM1#1 細胞へのゲフィチニブの効果を検討した。GR5+CADM1#1 腫瘍のゲフィチニブ投与群 ($n=6$)は、非投与群 ($n=6$)と比較してゲフィチニブ投与により腫瘍の消退は認められないものの、腫瘍体積が有意に小さい状態で安定して維持されていた ($p=0.0163$;Mann-Whitney U test) (図 17-E)。

これは、*in vitro* で示された結果と同様に、CADM1 を耐性細胞に発現させることでゲフィチニブ感受性が改善したためと考えられた。

ゲフィチニブ投与量に関しては、ゲフィチニブ感受性の HCC827 は 1 週間程度で消退し (図 17-C)、耐性 GR5 では腫瘍体積に影響を与えなかった (図 17-D)。このことから、投与量としては 50 mg / kg body は至適投与量であったと考えられた。

以上の解析から、MET 増幅によるゲフィチニブ獲得耐性細胞の増殖は、CADM1 の導入だけで部分的に抑制されること、更にゲフィチニブ感受性が改善し、相乗的な腫瘍抑制効果が得られることが明らかとなった。このことから、CADM1 の強制発現によって、CADM1 の発現による腫瘍抑制効果と、ゲフィチニブ感受性の回復という 2 種類の抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。

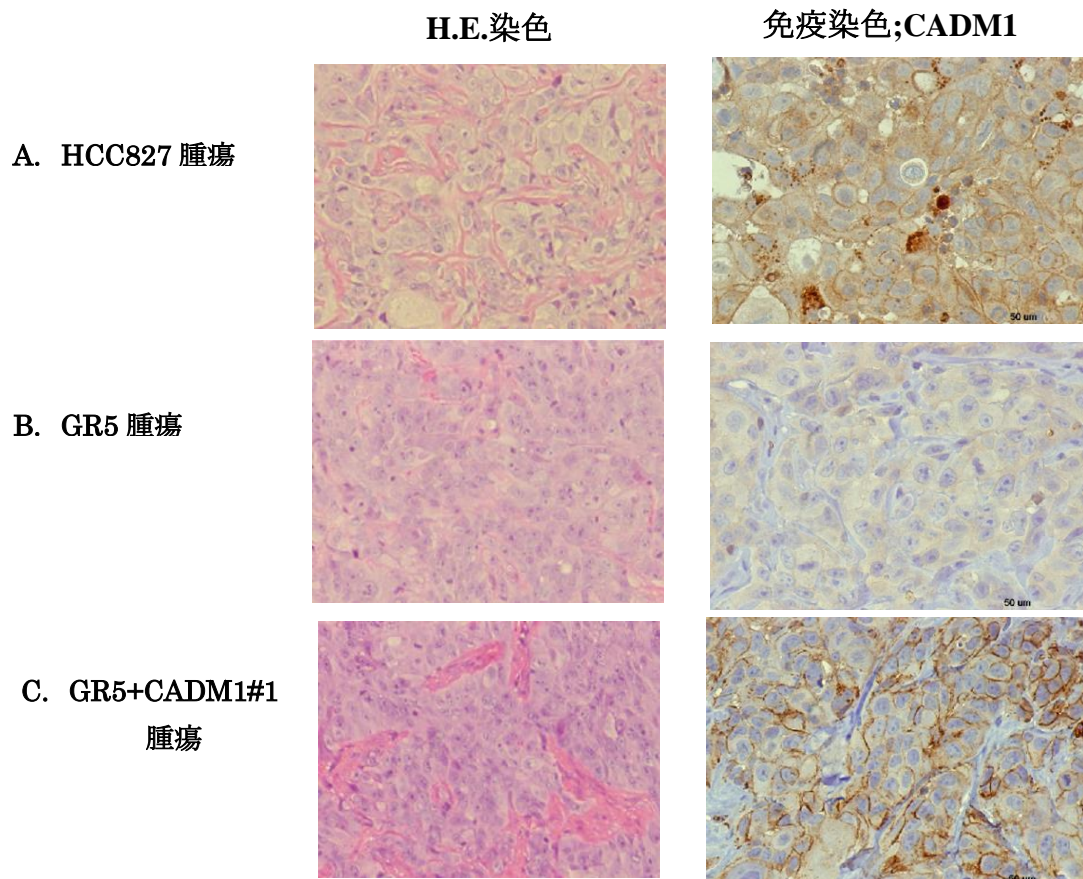


図 16; 異種異所性移植腫瘍における CADM1 の免疫染色

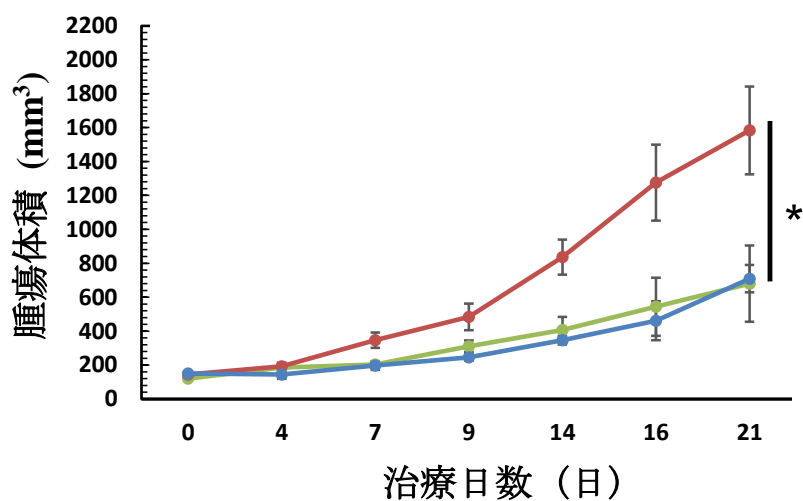
マウス皮下腫瘍を抗 CADM1 抗体で免疫染色した。

(A)HCC827 腫瘍では広く CADM1 の発現を認めた。発現は細胞膜上に局在していた (×200)。

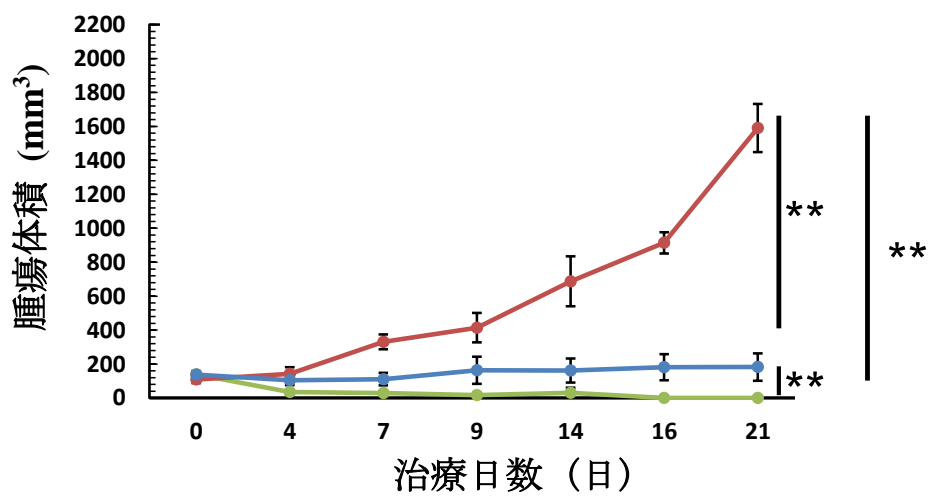
(B)GR5 腫瘍では CADM1 の発現を認めなかった(×200)。

(C)GR5+CADM1 腫瘍では広く CADM1 の発現を認めた。発現は細胞膜上に局在していた (×200)。

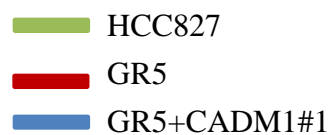
A. 非投与群; -ゲフィチニブ



B. 投与群; +ゲフィチニブ



*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$



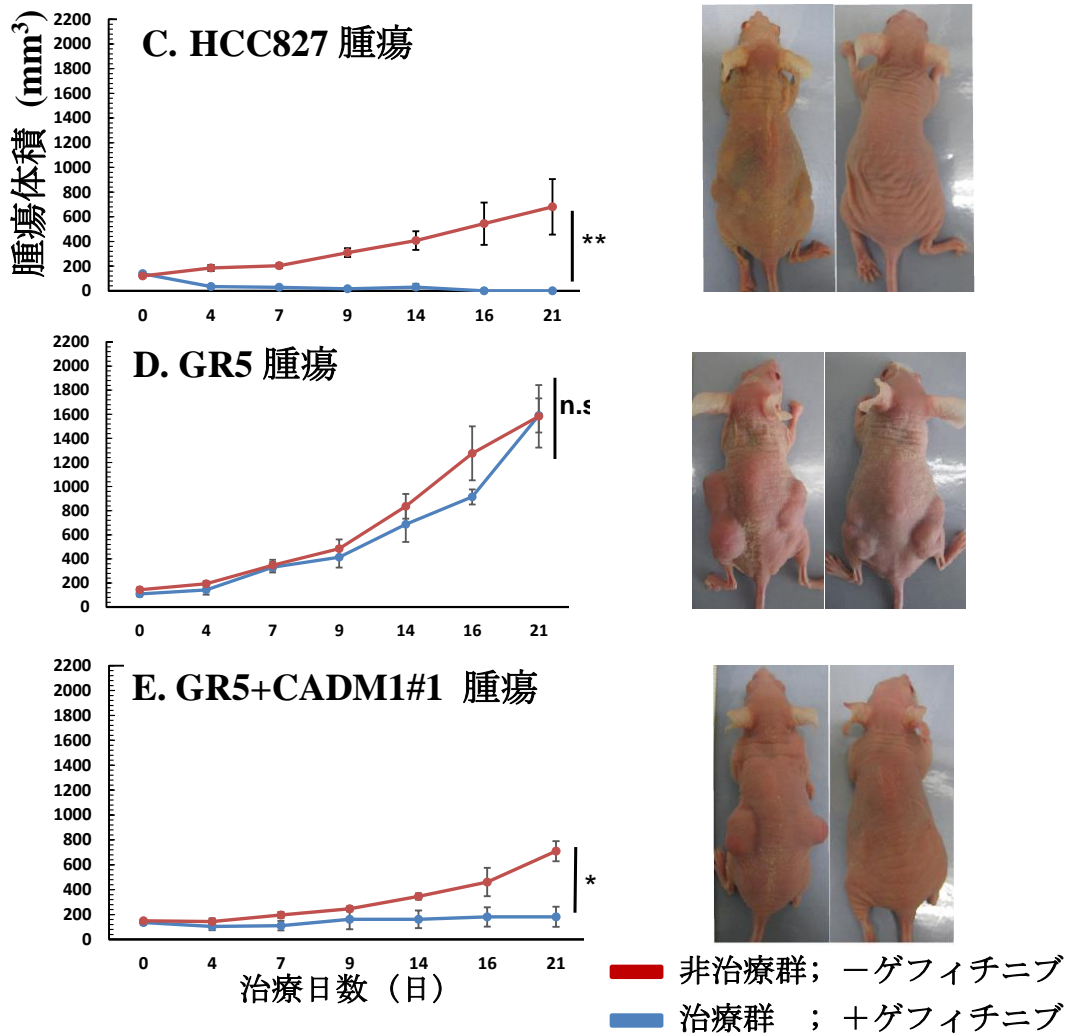


図 17: ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株 GR5 への CADM1 導入によるゲフィチニブ感受性に対する影響
HCC827、GR5 ベクター単独導入 GR5V6 細胞および CADM1 導入 GR5+CADM1#1 細胞で異種異所性移植マウスを作製した。腫瘍体積が 100-200 mm³ となったところで、ゲフィチニブ投与・非投与群に割り当てた。
(A)ゲフィチニブ非投与群 :1 回あたり PBS 50μl として週 5 回投与した。
(B)ゲフィチニブ投与群 :1 回あたりゲフィチニブ 50 mg / kg body として週 5 回投与した。
(C)ゲフィチニブ感受性腫瘍 :HCC827 腫瘍においてはゲフィチニブ投与群において速やかに腫瘍の退縮を認めた (左図)。
(D)ゲフィチニブ耐性腫瘍 :GR5 腫瘍ではゲフィチニブ投与群と非投与群で有意な腫瘍体積の違いは認められなかった。
(E) GR5+CADM1#1 腫瘍ではゲフィチニブ投与群の方が有意に腫瘍体積が小さかった (p<0.05)。* ; p<0.05, ** ; p<0.01, Mann-Whitney U test

細胞増殖マーカーKi-67によるCADM1の抗腫瘍効果の検証

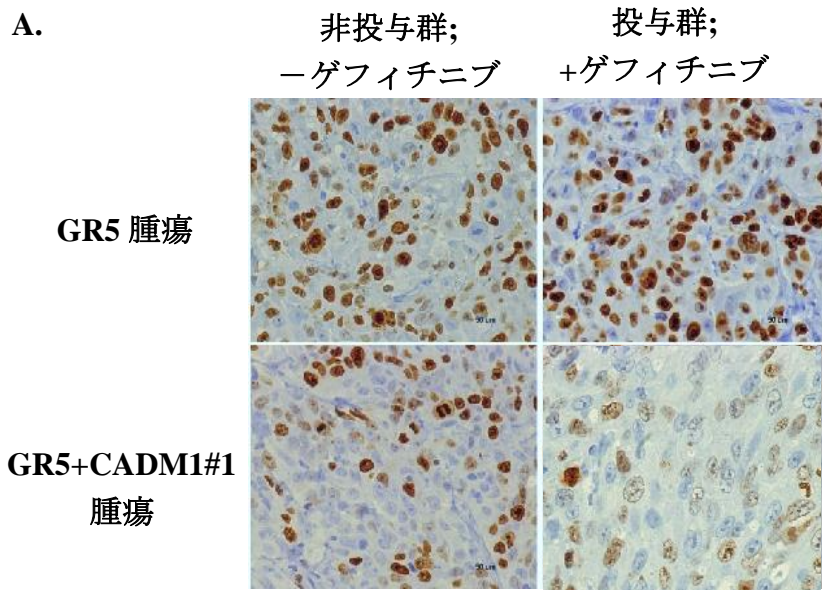
次に、GR5+CADM1#1 腫瘍がゲフィチニブ投与群において、小さい体積で安定して維持される理由を検討した。*in vitro* において GR5+CADM1#1 にゲフィチニブを投与することで、Erk の活性が抑制されるものの、PI3K /Akt 経路は維持されることが示された。CADM1 安定発現細胞を用いた Sub-G1 ピーク解析では、ゲフィチニブ投与による明らかなアポトーシスの誘導は認められなかった (data not shown)。そのため、細胞の増殖は抑制されるものの細胞死は誘導されず、腫瘍は消退しないものと考えた。

そこで、HCC827 細胞、GR5 細胞と GR5+CADM1 細胞による異種異所性移植マウスを 21 日間のゲフィチニブ投与・非投与後に安楽死させて、腫瘍を摘出した。その後、抗 Ki-67 抗体にて免疫染色を行なった (図 18-A)。Ki-67 に関して説明する。Ki-67 は細胞周期関連核タンパク質であり、増殖期に発現している。休止期には発現していないため、細胞増殖と細胞周期のマーカーとして用いられている。乳がんにおいては広く Ki-67 スコアリング (MIB-1 インデックス)として用いられており、予後因子として報告されている [47-50]。通常、300-1000 個のがん細胞における核染色細胞をカウントして評価する。本研究においては、400-500 個のがん細胞をカウントして、Ki-67 陽性細胞率 (%)で評価

した (図 18-B)

まず GR5 腫瘍において、ゲフィチニブ投与群と非投与群を比較する。両者は Ki-67 が広く発現しており、高い増殖能を有することが示唆された (Ki-67 陽性細胞率 :76.3 vs 74.4%)。またゲフィチニブ投与の有無で、増殖能に差は認められなかった($p=0.6682$;Mann-Whitney *U* test)。これは GR5 細胞がゲフィチニブに対して耐性を有し、腫瘍耐性に有意差がないことにも合致している。

次に、CADM1 の腫瘍抑制能を検討するために、ゲフィチニブ非投与群で GR5 腫瘍と GR5+CADM1#1 腫瘍を比較した。GR5 腫瘍と比較して、GR5+CADM1#1 腫瘍では Ki-67 の発現が有意に減少しており (Ki-67 陽性細胞率 :76.3 vs 61.2%, $p=0.0039$;Mann-Whitney *U* test)、CADM1 を欠如した細胞に CADM1 を導入することで腫瘍増殖能が低下することが示された。また、ゲフィチニブ投与に対する効果を比較するために、GR5+CADM1#1 腫瘍のゲフィチニブ投与群と非投与群を比較すると、投与群で Ki-67 の発現が有意に減少しており、ゲフィチニブ投与により増殖能が低下したことが示された (Ki-67 陽性細胞率 :61.2 vs 53.4%, $p=0.0389$;Mann-Whitney *U* test)。以上から、CADM1 の発現が欠如したゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞に、CADM1 を導入することで、腫瘍の増殖が抑制された。また、ゲフィチニブ投与により相乗的な増殖抑制効果を得ることが確認された。



B.

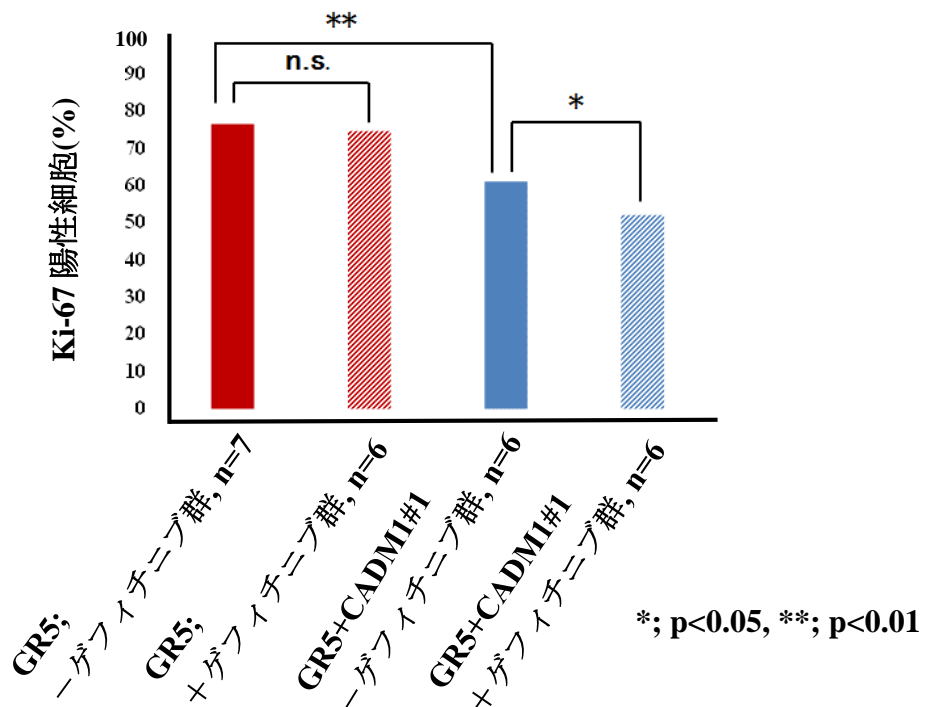


図 18 ; 異種異所性移植担癌マウスにおける腫瘍増殖能の比較

ゲフィチニブ感受性肺腺がん細胞株 HCC827、ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株 GR5 ベクター単独導入 GR5V6 細胞および CADM1 導入 GR5+CADM1#1 細胞を異種異所性に皮下移植した。21 日間のゲフィチニブ投与・非投与の後に安楽死させて腫瘍を摘出した。抗 Ki-67 抗体で染色した後、Ki-67 陽性細胞の比率 (%) を、Ki-67 陽性細胞数をがん細胞数で割って算出した (total cells>300cells)(×200)。

テトラサイクリン発現誘導システムによる **CADM1** コンディショナル発現系の 確立

次に、テトラサイクリン発現誘導システムを用いて、同様の実験を行なうこととした。

そこでまず、ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞 **GR5** においてテトラサイクリン依存的に **CADM1** を発現する **GR5-Tet-On-CADM1** 細胞株を **Tet-One inducible system** を用いて樹立した。

本細胞の特性を確認するために、テトラサイクリン誘導体ドキシサイクリン投与により発現を開始する濃度、発現開始時間、発現の局在を確認した。

発現開始濃度に関しては、ドキシサイクリン 100 ng/ml 投与より発現を認め、濃度依存的に発現が増強することを確認した (図 19-A)。

また発現開始時間に関しては、ドキシサイクリン 1000 ng/ml を投与して 6 時間後より発現を認め、以後 24 時間まで発現が増強した (図 19-B)。

次に、蛍光免疫染色にて **CADM1** の発現する局在を調べるため、ドキシサイクリンを投与して発現レベルが最も増強される 24 時間後に観察した。ドキシサイクリンを投与した細胞において、**CADM1** は細胞の膜上に発現していた。一方、非投与細胞では **CADM1** の発現を認めなかった (図 19-C)。

次に、同細胞で異種異所性移植マウスを樹立した際、ドキシサイクリンで CADM1 の発現が誘導されるかを確認した。GR5-Tet-On-CADM1 細胞を 1×10^7 細胞 / PBS 200 μ l に調整して、Balb/c nude mouse の背側に皮下注射することで異種異所性移植マウスを作製した。腫瘍体積が 100-200 mm^3 となったところで、ドキシサイクリンを飲水ボトル内に混中して 2 mg /ml の濃度として連日投与を開始した。投与開始から 1 週間後に安楽死させて、CADM1 の発現を免疫染色にて確認した。ドキシサイクリン投与例で、腫瘍内に CADM1 の発現を認めた。発現分布は、CADM1 恒常発現株と異なり、すべての細胞ではないが広く発現していた (図 19-D)。これは腫瘍内において血管新生などの影響で、血流分布が不安定であり、ドキシサイクリンによる遺伝子発現の誘導もその血流分布の影響を受けるためと考えた。発現局在は主に膜上であった。さらに同様に GR5-Tet-On-CADM1 細胞で腫瘍を作成し、ドキシサイクリンを投与しなかった症例では、CADM1 の発現がないことを確認した。

ドキシサイクリンによる CADM1 の発現誘導は限定的ではあるものの、主に細胞膜上に発現しており、機能的には問題ないものと考えた。また *in vivo* における CADM1 の発現も 2 mg /ml 飲水ボトル内混入にて適切に誘導されると考えた。

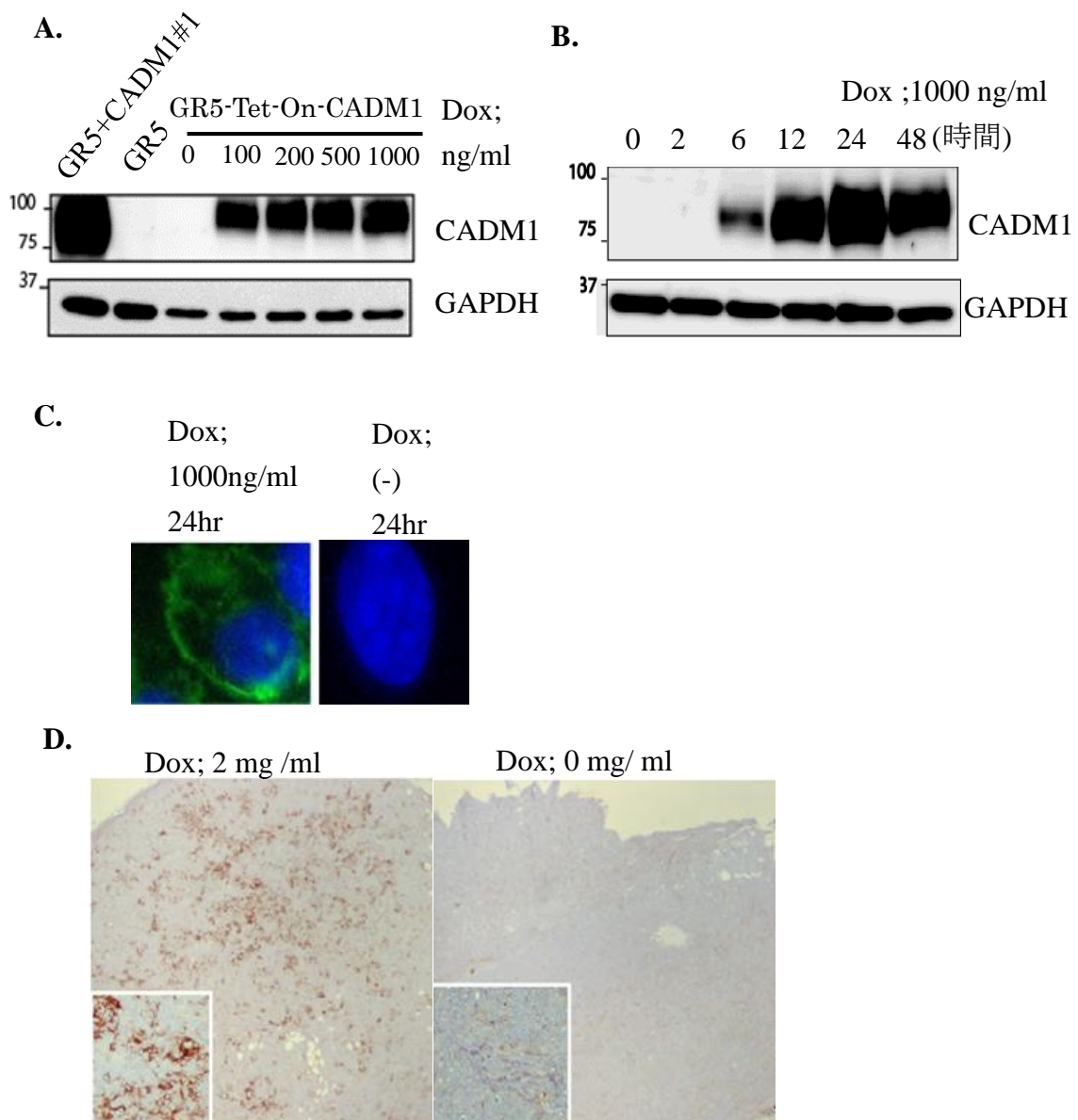


図 19 :GR5-Tet-On-CADM1 細胞の特性

- (A) ドキシサイクリンを 0-1000 ng /ml で濃度を振って、24 時間後に発現強度を確認した。ドキシサイクリン濃度依存的に発現の増強を認めた。
- (B) ドキシサイクリン;1000 ng/ml を投与後、0-48 時間で発現レベルを確認した。6 時間より発現を認めて、24 時間で平衡状態となった。
- (C) ドキシサイクリン 1000 ng/ml を投与して 24 時間後、蛍光免疫染色で CADM1 の発現局在を観察すると、発現は膜上に局在していた。緑:CADM1。
- (D) *in vivo* における CADM1 の発現分布・局在を確認した。腫瘍内に広く発現しており、主に膜上で一部は細胞質で発現していた(ドキシサイクリン :2 mg /ml 飲用) (×200)。

テトラサイクリン誘導系による **CADM1** の発現誘導は、ゲフィチニブ感受性を回復し、抗腫瘍効果を示す。

GR5-Tet-ON-CADM1 細胞株を用いて、**CADM1** の発現を誘導することによる腫瘍抑制効果とゲフィチニブ感受性改善による抗腫瘍効果を検討した。

以下のように異種異所性移植モデルを樹立した。1×10⁷ 細胞の GR5-Tet-ON-CADM1 細胞を PBS 200 μl に懸濁して、Balb/c nude mouse の背側皮下に注射した。皮下注射後、約 1-2 週間で細胞が生着して腫瘍が形成された。腫瘍体積が 100-200 mm³ となった時点でドキシサイクリン投与・非投与群に分けて、更に同日から各々をゲフィチニブ投与群と非投与群に無作為に割り当てて計 4 群の観察を行なった。ゲフィチニブ投与群はゲフィチニブを 1 回あたり 50 mg/kg body として、非投与群は PBS を各々 50 μl としてゾンデを用いて経胃的に投与した。週 5 回投与して、21 日間観察した (図 15-B)。

まず、移植した腫瘍において **CADM1** が発現していない状態で、親株である GR5 と同様にゲフィチニブに耐性を有するか検討した。ドキシサイクリン非投与群でゲフィチニブ投与・非投与群を比較すると、腫瘍体積に有意な差は認められず (p=0.3017 ;Mann-Whitney *U* test) (図 20-A)、GR5 と同様にゲフィチニブ耐性を有することが確認された。

そこで、CADM1 の腫瘍抑制効果に関して、ゲフィチニブ投与を行っていないドキシサイクリン投与・非投与群で検討した。両者において、CADM1 の発現の有無で腫瘍体積に有意な差は認められなかった ($p=0.7488$;Mann-Whitney U test) (図 20-B)。

次に、ゲフィチニブに対する感受性改善効果を CADM1 発現腫瘍においてゲフィチニブ投与・非投与群を比較することで検討した。ゲフィチニブ投与群では腫瘍は消褪しないものの、非投与群と比較して腫瘍体積が有意に小さい状態で維持されていた ($p=0.025$;Mann-Whitney U test) (図 20-C)。

以上から、GR5-Tet-ON-CADM1 腫瘍は CADM1 の発現のみでは腫瘍増殖が抑制されないことを確認した。

一方、CADM1 の発現を誘導することで、ゲフィチニブに対する感受性を改善し腫瘍増殖を抑制するため、腫瘍体積が小さい状態で維持されることを確認した。

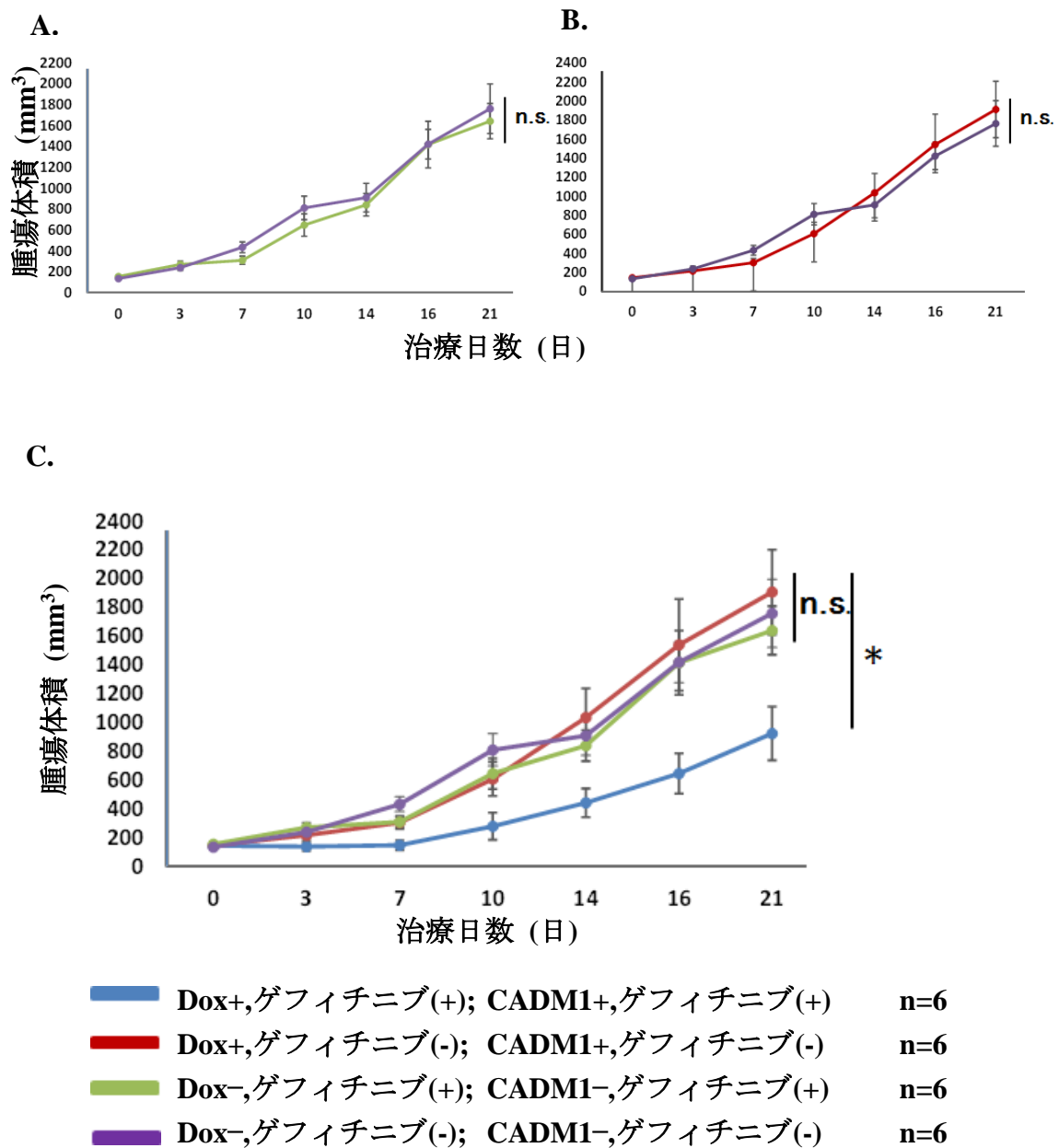


図 20 :誘導系細胞における異種移植

6-8 週齢メスのヌードマウスへ、GR5-Tet-On-CADM1 細胞を用いて異種異所性移植モデルを樹立した。腫瘍体積が 100-200 mm³ となったところで、ドキシサイクリン投与・非投与群に割り当て、更にゲフィチニブ投与群・非投与群に割り当てた。(A) ドキシサイクリン非投与群でゲフィチニブ投与・非投与群で腫瘍体積を比較した。(B) ドキシサイクリン投与・非投与群で腫瘍体積を比較した。(C) ドキシサイクリン投与・非投与群に割り振り、更にゲフィチニブ投与・非投与群の計 4 群で腫瘍体積を比較した。ドキシサイクリンとゲフィチニブ併用群で腫瘍体積が有意に小さかった。*; p<0.05, Mann-Whitney *U* test

CADM1 発現アデノウイルスベクターは、ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株 GR5 にゲフィチニブ感受性を回復させる。 - 培養細胞での検討 -

これまでの結果より、MET 増幅によりゲフィチニブ耐性を獲得し、また CADM1 を欠如した肺腺がん細胞株に、CADM1 を導入することでゲフィチニブ感受性を改善し、細胞増殖を抑制することを確認した。

そこで、ゲフィチニブ耐性腫瘍に CADM1 を導入することが、有用な抗腫瘍戦略になり得るのではないかと考えた。そこで実験的な治療方法として、ゲフィチニブ耐性腫瘍に外来性に CADM1 の発現を導入してゲフィチニブ投与を行うこととした。

遺伝子を外来性に導入する方法としては、ウイルスベクターと非ウイルスベクター (プラスミド、バクテリアベクター)などが知られている。本研究では、がん治療や遺伝性疾患に広く用いられるウイルスベクターを用いた遺伝子導入に着目した。これまでの報告で、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスによる遺伝子治療が報告されている。その中で本研究においては、アデノウイルスベクターを選択した。アデノウイルスベクターの特徴としては染色体への組み込みが低頻度であり発現は短期である、また分裂・非分裂細胞に遺伝子導入が可能であり高い発現を得ることが出来る。昭和大学、大場基講師より

CADM1 を発現するアデノウィルスベクター (Ad-CADM1)、コントロールベクターを導入したアデノウィルス (Ad-vec)をいただいた (図 21)。CADM1 遺伝子の発現量をウェスタンブロットで確認したところ、アデノウィルス感染細胞の方が GR5+CADM1#1 細胞より発現量が高かった (図 22)。

まず、*in vitro* にて GR5 細胞に Ad-CADM1、Ad-vec を感染させてアデノウィルス感染と CADM1 遺伝子発現による影響を検討した。

そこで、Ad-CADM1 と Ad-vec を用いた 2 群で比較検討した。まずアデノウィルス自体の影響を検討するため Ad-vec 感染による細胞増殖に及ぼす影響を検討した。MOI (Multiplicity of infection): 0 と比較すると MOI: 5 より有意な増殖抑制を認めた ($p=0.0042$;Student's *t* test)。これはアデノウィルス自体の殺細胞効果によるものと考えられた。一方で、Ad-CADM1 感染細胞は MOI:0.5 より、Ad-vec 感染細胞と比較して有意な細胞生存率の抑制を認めた ($p=0.001$;Student's *t* test)。以降 MOI:100 まで同様の傾向であり、これは CADM1 発現による腫瘍抑制効果と考えられた (図 23-A)。以上から、*in vitro* においてゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞 GR5 細胞に CADM1 発現アデノウィルスを感染させることで、一過性発現であってもアデノウィルスによる殺細胞効果と CADM1 による腫瘍抑制効果で、腫瘍細胞の増殖を抑制することが示された。

次にアデノウィルスを用いて CADM1 を導入することにより、ゲフィチニブ

に対して感受性改善効果が得られるか検討した。Ad-CADM1、Ad-vec 感染細胞を更に、各々ゲフィチニブ投与群と非投与群に無作為に分けて計 4 群で比較検討した。Ad-CADM1 感染細胞群では、MOI :0.5 よりゲフィチニブ投与群において非投与群と比較して有意な増殖抑制を認めた ($p=0.0130$;Student's t test)。以後 MOI :5 まで同様に有意な増殖抑制を認めた。一方、コントロール群では、MOI :5 までゲフィチニブ投与群・非投与群で有意な増殖抑制は認められなかった ($p=0.9159$;Student's t test) (図 23-B)。

以上の結果から、MET 増幅によりゲフィチニブ耐性を獲得した肺腺がん細胞において、CADM1 発現アデノウィルスを感染させて CADM1 の一過性発現を誘導することで、アデノウィルスによる殺細胞効果、CADM1 による抗腫瘍効果を獲得し、更にゲフィチニブ感受性改善により相乗的な増殖抑制効果を得ることが確認された。

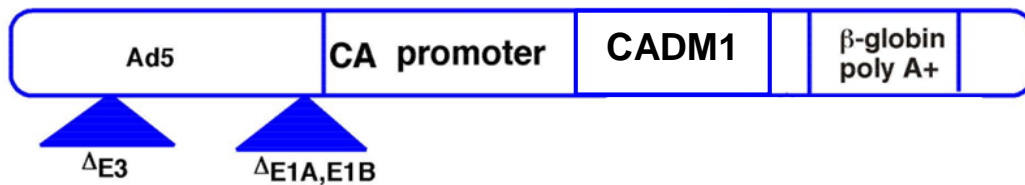


図 21 :CADM1 発現アデノウィルスベクター(Ad-CADM1)の構造
E1 欠損 /E3 欠損型アデノウィルスベクターに CADM1 全長を導入して作成した。

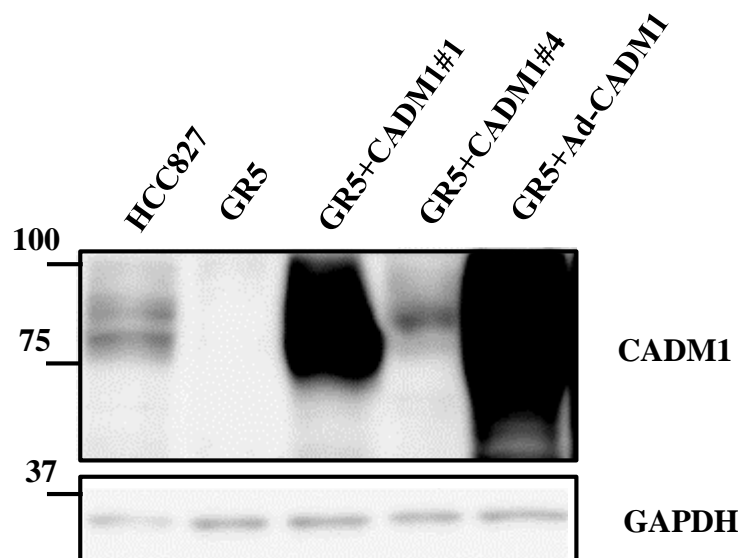


図 22 :Ad-CADM1 感染 GR5 細胞における CADM1 の発現確認
Ad-CADM1 を MOI :1 となるように GR5 細胞に感染させた。感染 24 時間後に細胞を回収して、ウェスタンブロットを行なった。GR5+Ad-CADM1 は HCC827、GR5+CADM1#1,#4 と比較して非常に高い CADM1 の発現を示した。

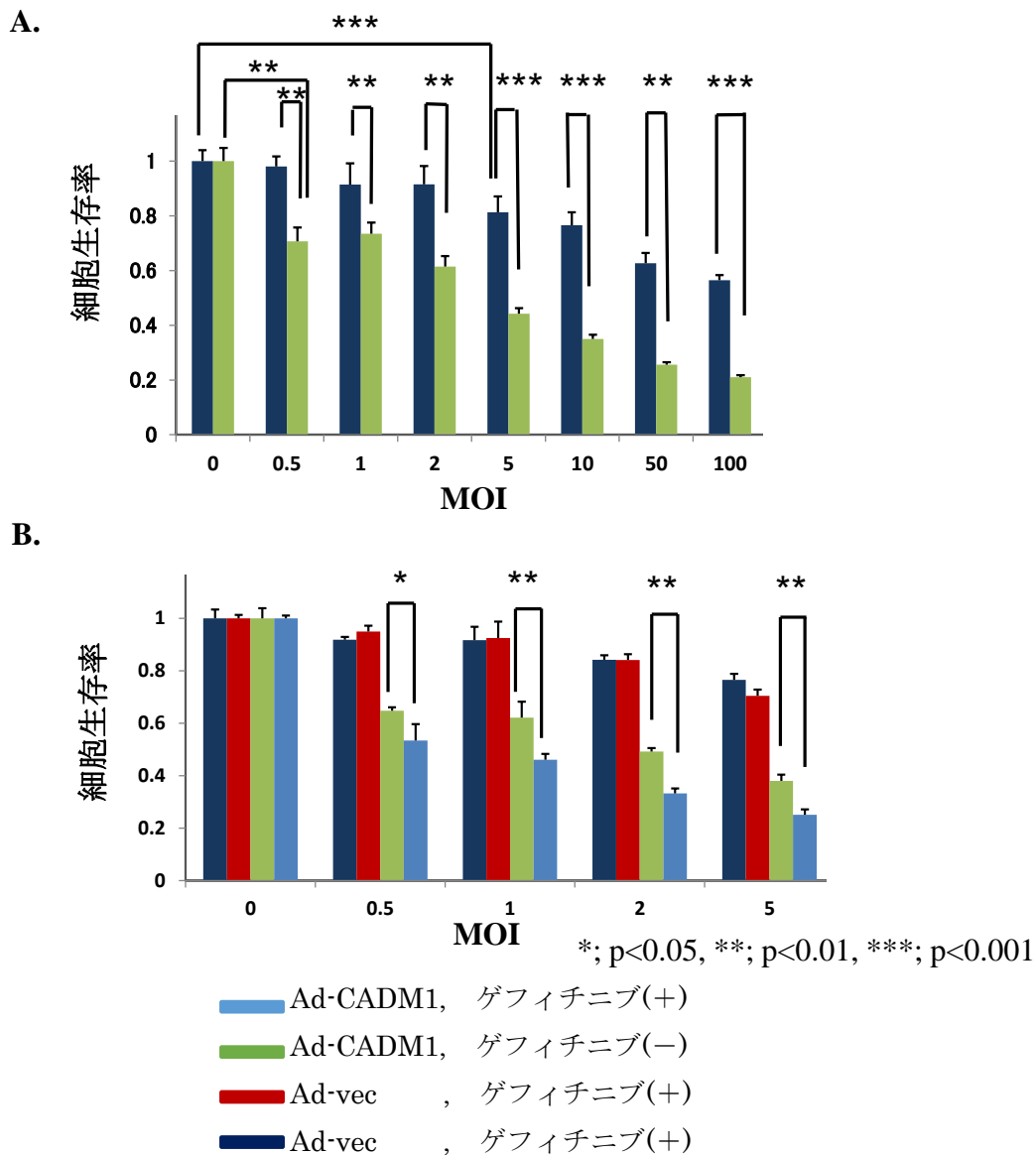


図 23 :CADM1 発現アデノウイルス感染による、ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株に対するゲフィチニブ治療への影響

(A)ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株 GR5 細胞に、CADM1 発現アデノウイルス (Ad-CADM1)とコントロールベクターを導入したアデノウイルス (Ad-vec)を感染させた。72 時間後に吸光度を測定した。Ad-vec 感染により MOI (Multiplicity of infection) :0 と比較すると MOI :5 より有意な増殖抑制を認めた。Ad-CADM1 感染細胞は MOI :0.5 より、Ad-vec 感染細胞と比較して有意な細胞生存率の抑制を認めた以降 MOI :100 まで同様の傾向であった。

(B)上記を更にゲフィチニブ投与群 (1 μ M)と非投与群で群分けして、72 時間後に吸光度を測定した。Ad-CADM1 感染細胞群では、MOI :0.5 よりゲフィチニブ投与群において非投与群と比較して有意な増殖抑制を認めた。

CADM1 発現アデノウィルスベクターは、ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株のゲフィチニブ感受性を改善させ、腫瘍縮小効果を示す。

- *in vivo* での実験的遺伝子治療の試み -

in vitro において、アデノウィルスによる殺細胞効果、CADM1 発現による抗腫瘍効果とゲフィチニブ感受性改善による抗腫瘍効果を確認した。そこで実験的治療モデルとして、ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞異種異所性移植マウスに CADM1 発現アデノウィルスを用いて遺伝子導入することとした。

アデノウィルス投与方法として、静脈内投与、腹腔内注射、腫瘍内投与等が報告されている。

本研究は、ゲフィチニブに対する感受性改善効果を検討することが目的である。そのためには、CADM1 の発現が腫瘍内において出来るだけ一定の濃度で維持されることが肝要となるので、CADM1 発現アデノウィルスを腫瘍内注射により投与することとした。投与頻度としては、アデノウィルスの発現は一過性であり、腫瘍内注射においては 3 日-1 週間発現が保持されるとの報告がある [51]。そのため、まずアデノウィルス注射 3 日後と 1 週間後で CADM1 の発現を免疫染色で確認した。

3 日後では局所的な発現が維持されていたが、1 週間後にはほぼ発現が欠如し

ていた (図 24)。以上から少なくとも 3-4 日置きのアデノウイルス腫瘍内注射が必要であると考えられた。また、投与ウイルス量による発現分布を確認した。ウイルス量が増えるにつれて、CADM1 発現範囲が広がっていた (図 25)。本研究においては、 5×10^7 ifu /回を第 0、4、7、10 日に腫瘍内注射した。

そこで、以下のように異種異所性移植モデルを樹立した。 1×10^7 細胞の GR5 細胞を PBS 200 μ l に懸濁して、Balb/c nude マウスの背側皮下に注射した。皮下注射後、約 1-2 週間で細胞が生着して腫瘍が形成された。腫瘍体積が 100-200 mm³ となった時点で Ad-CADM1、Ad-vec、PBS 腫瘍内注射群に分けて、更に同日から各々をゲフィチニブ投与群と非投与群に無作為に割り当てて計 6 群の観察を行なった。ゲフィチニブ投与群はゲフィチニブを 1 回あたり 50 mg /Kg body とし、非治療群は PBS を各々 50 μ l とし、ゾンデを用いて経胃的に投与した。週 5 回投与して、14 日間観察した (図 15-C)。

まず、アデノウイルス腫瘍内注射における抗腫瘍効果を検討した。ゲフィチニブ非投与群において、PBS と Ad-vec 腫瘍内注射群を比較すると両者において有意な腫瘍体積の違いは認められず ($p=0.7285$;Mann-Whitney *U* test)、腫瘍内注射においてはアデノウイルスによる抗腫瘍効果は認められなかった。

更に、CADM1 による腫瘍抑制効果を検討するために、ゲフィチニブ非投与群において PBS と Ad-CADM1、Ad-vec と Ad-CADM1 を比較した。両者において

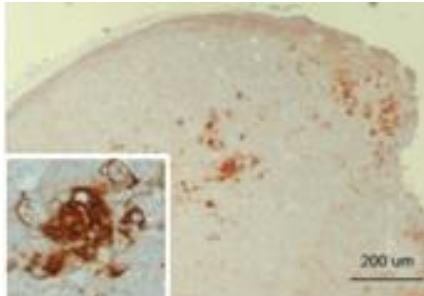
有意な腫瘍体積の違いは認められず ($p=0.3545$ 、 0.4062 ;Mann-Whitney U test)、
CADM1 による抗腫瘍効果は確認することが出来なかった。

そして、CADM1 導入によるゲフィチニブ感受性改善効果を検討することとした。まず PBS、Ad-vec 腫瘍内注射群においてゲフィチニブ投与群・非投与群の腫瘍体積を比較検討した。各々において有意な腫瘍体積の違いは認められなかった (PBS 腫瘍内注射群 ; $p=0.9079$ 、Ad-vec 腫瘍内注射群 ; $p=0.1325$;Mann-Whitney U test)。

一方、Ad-CADM1 腫瘍内注射群において、ゲフィチニブ投与群と非投与群を比較検討すると、ゲフィチニブ投与群において有意に腫瘍体積が小さかった ($p=0.0066$; Mann-Whitney U test) (図 26)。以上より、ゲフィチニブ耐性肺がん腫瘍において、CADM1 発現アデノウィルス腫瘍内に注射し、ゲフィチニブを投与することによりゲフィチニブに対する感受性が改善されて、腫瘍増殖を抑制することが確認された。

Ad-CADM1 腫瘍内注射

注射 3 日後



注射 7 日後

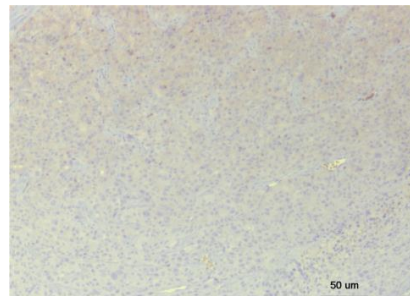


図 24 :Ad-CADM1 腫瘍内注射における CADM1 の発現期間と分布

ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞 GR5 細胞で異種異所性移植モデルを樹立。

5×10^7 ifu /回注射して、3 日後と 7 日後に安楽死させて、免疫染色で CADM1 の発現を確認した。

注射 3 日後には CADM1 の局所的な発現を認めた ($\times 200$)。

注射 7 日後には CADM1 の発現は確認できなかった。

Ad-CADM1 腫瘍内注射

注射 : 5×10^7 ifu /回

注射 : 1×10^8 ifu /回

注射 : 2×10^8 ifu /回

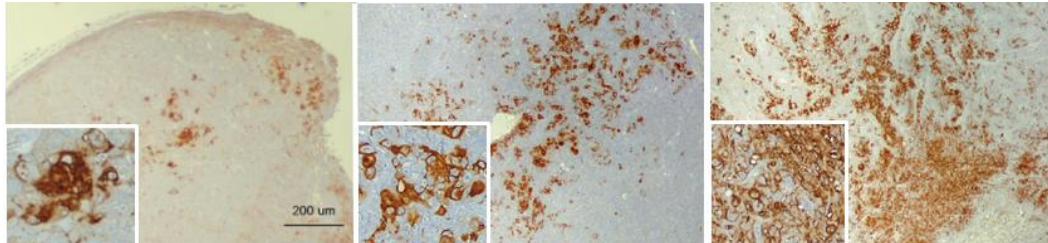
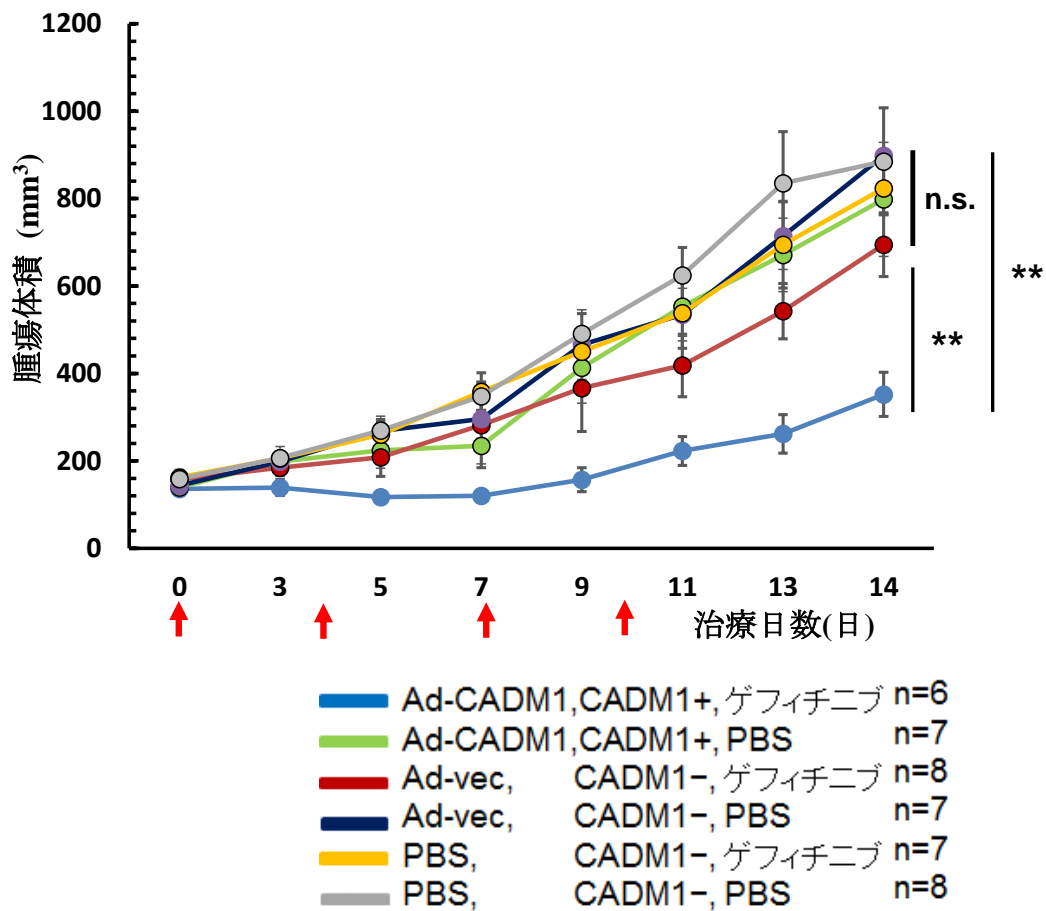


図 25 :Ad-CADM1 腫瘍内注射における CADM1 の発現分布

ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞 GR5 細胞で異種異所性移植モデルを樹立した。腫瘍体積が $100-200 \text{ mm}^3$ となったところで、ウイルス量を 5×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 ifu /回として注射して、3 日後に安楽死させて、免疫染色で CADM1 の発現を確認した。

ウイルス量の増加に伴い発現分布が広がっていた。CADM1 の発現はいずれも膜上に局在していた ($\times 200$)。



↑; 腫瘍内注射日 第0、4、7、10日

図 26 :CADM1 発現アデノウイルス腫瘍内注射によるゲフィチニブ治療への影響

6-8 週齢メスのヌードマウス (BALB /c^{nu/nu})皮下へ、ゲフィチニブ耐性肺腺がん細胞株 GR5 細胞 1×10^7 個を PBS 200 μ l に懸濁して皮下注射した。腫瘍体積が 100-200 mm³ となったところで、Ad-CADM1、Ad-vec と PBS 腫瘍内注射群に割り当て、更にゲフィチニブ投与群 (ゲフィチニブ 50 mg /kg body、週 5 回)、ゲフィチニブ非投与群 (PBS 50 μ l、週 5 回)に割り振った (計 6 群)。腫瘍内注射は各々 5×10^7 ifu /回として、14 日間の観察期間中、第 0, 4, 7, 10 日に行なった。CADM1 発現アデノウイルスを腫瘍内に注射をして、ゲフィチニブ投与を行なった群で、有意に腫瘍体積が小さかった ($p < 0.05$)。他 5 群で腫瘍体積に有意な差は認められなかった。*: $p < 0.01$; Mann-Whitney U test

考察

分子標的薬であるゲフィチニブやエルロチニブは臨床において著明な抗腫瘍効果を示す非常に有用な薬剤である。しかし多くの症例で、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。

肺腺がんにおける ゲフィチニブの耐性機序としては、その約 50%が EGFR 遺伝子の T790M 変異による耐性獲得であり、また、5-22%は MET 遺伝子増幅による耐性獲得である [27-30]。さらに、SCLC への形質転換や HGF の過剰分泌による MET 経路の恒常的な活性化により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。近年、耐性の分子機序が明らかになるにつれて、耐性を克服するための治療方法が研究されてきている。

特に T790M 二次的変異に対する耐性克服法はめざましい。ゲフィチニブやエルロチニブは第 1 世代 EGFR-TKI と呼ばれるが、第 2 世代 EGFR-TKI であるアファチニブ (afatinib) は、一部の臨床試験 (Lux-Lung4) で T790M 変異を有する肺がん患者への治療効果が報告された [52]。また、第 3 世代 EGFR-TKI: AZD9291、CO-1686 (ロシレチニブ) は T790M 耐性変異腺がんを選択的かつ不可逆的に阻害する可能性が前臨床モデルから明らかにされつつある [53-55]。

一方で、MET 遺伝子増幅に基づく耐性獲得の克服法はやや立ち遅れている。

後述するように、チバンチニブ (tivantinib ;ARQ-197)等の新規薬剤の臨床試験が続けられているが、未だ決定的な効果を持つ分子標的薬は登場していない。

そこで、MET 増幅による EGFR-TKI 耐性の克服と、将来的な臨床応用を目標として、当研究室において同定された CADM1 に着目し、本研究を遂行した。近年我々は、CADM1 が HGF-MET 経路に対して抑制的に働く可能性を見出した。そのため、EGFR-TKI ゲフィチニブに対する耐性獲得機構の中で、特に MET 増幅に起因する耐性に着目した。

桑野はゲフィチニブに感受性を有する HCC827 細胞、MET 増幅によりゲフィチニブに耐性を獲得した GR5 および GR6 細胞、GR5 細胞に CADM1 を導入した GR5+CADM1 細胞を用いて検討した。その結果、1) 親株と異なり、耐性株 GR5 および GR6 細胞 では CADM1 の発現が認められないこと、2) CADM1 発現細胞では CADM1 と MET が複合体を形成すること、更に 3) GR5 に CADM1 を過剰発現させることで、ゲフィチニブに対する感受性が部分的に回復することを見出した。この時、MET とその下流因子である Erk の活性が抑制された。これらのことから、CADM1 を過剰発現させることで、MET 増幅による EGFR-TKI 獲得耐性を克服しうる可能性が示唆された [42]。

そこで本研究では、まず *in vivo* におけるゲフィチニブ感受性改善効果を検討するために、ゲフィチニブ感受性細胞、耐性細胞と CADM1 導入細胞を用いて異

種異所性移植担癌マウスモデルを作製した。

まず、ゲフィチニブ非投与群における各々の腫瘍の増殖能について考察する。マウス担癌モデル実験において、ゲフィチニブ耐性細胞由来の腫瘍は、感受性株と *CADM1* 導入した耐性細胞由来の腫瘍に比べて、有意に腫瘍体積が大きかった。耐性細胞 GR5 は *CADM1* の発現を欠いている。従って、*MET* 増幅による影響だけでなく *CADM1* の発現欠損が腫瘍増殖能を亢進している可能性が示唆される。ゲフィチニブ耐性獲得の過程で、*CADM1* 遺伝子の発現プロモーター領域がメチル化などにより不活化されることで、一部の細胞に *MET* 増幅が惹起されて、他の細胞と競合的に増殖することで形質として固定された可能性が考えられる。

次に、ゲフィチニブ投与量について考察する。*in vitro* での薬剤感受性試験と *in vivo* での薬剤投与効果を比較する際、問題となるのは投与薬剤の血行動態である。*in vivo* におけるゲフィチニブ感受性を検討する際、有効血中濃度が維持されているかが重要となる。

通常、ヒトにおいてはゲフィチニブ 250 mg /日が経口投与で毎日投与される。ヒトにおいてゲフィチニブ 225 mg 投与時の最高血中濃度 (*Cmax*) は約 0.7 μM で [56]、また、ゲフィチニブ 250 mg 投与時の血中トラフ値は約 0.4 μM と考えられている [57]。マウスにおいてはゲフィチニブ 50、100、200mg /回投与にて

各々最高血中濃度 435.8 ± 664.5 、 3943.5 ± 2103.7 と 94543 ± 29 nM であり、また血中トラフ値は投与後 16 時間で 50 mg /kg 投与は 62.6 ± 56.6 nM、100 mg /kg 投与は 1081.5 ± 873.9 nM との報告がある [58]。一方で、ゲフィチニブ投与患者において、投与後 8 日目の血中濃度を測定したところ患者間で $0.282\text{--}6.547\mu\text{M}$ の差があり [59]、また投与後に手術で腫瘍を摘出して腫瘍内のゲフィチニブ血中濃度を調べたところ、血中濃度 :518 nM に比較して腫瘍内のゲフィチニブ濃度は 22,760 nM と 40 倍であったとの報告もあり [60]、必ずしも投与量がそのままがん細胞における曝露濃度とはならないことが示唆される。ここで、先行研究における IC50 値に言及する。HCC827 : 23 ± 23 nM、GR5 : $10\mu\text{M}$ 以上で GR5+CADM1#1 : 503 ± 724 nM であり、先のマウス体内の血中濃度を考慮した場合、100 mg /Kg 以上の投与が望ましい。しかし、本実験の予備実験において 100 mg /Kg 投与では、合併症に伴う死亡や体重減少が著しかった。そこで、50 mg /kg としたところ合併症なく薬剤投与を行なうことが出来た。また、同投与量において HCC827 の腫瘍退縮をきたし、GR5 腫瘍で耐性を示したため 50 mg /Kg を選択した。薬物血中濃度=腫瘍細胞への薬剤投与濃度とした場合、阻害効果を期待できる濃度よりは低くなってしまふ。しかし、上述したように細胞レベルでの IC50 値と血中薬物濃度を単純に比較すること困難であり、効果を認められないようであれば薬剤投与量を増量することとして実験を開始した。その結果、ゲフィチニブ 50 mg

/Kg/回投与は HCC827 に退縮をきたし、かつ GR5 には変化を与えなかった。しかし、GR5+CADM1 腫瘍において退縮はきたさないものの小さい状態で維持されており、*in vitro* での結果を十分に補足するものであった。そのため、50 mg/Kg/回投与は増殖抑制をきたす程度には、十分血中濃度が維持されていたものと考えられた。

CADM1 安定発現細胞株を用いたマウスモデルでは、ゲフィチニブ感受性改善と腫瘍抑制という 2 つの抗腫瘍効果を示した。更に、テトラサイクリン発現誘導システムを用いて樹立した GR5-Tet-On-CADM1 マウスモデルにおいても、CADM1 の発現を誘導することでゲフィチニブ感受性を回復した。一方で、CADM1 の発現を誘導しても腫瘍の増殖は抑制されなかった。そこで、両者のモデルによる違いを検討するため、培養細胞における CADM1 の発現強度と腫瘍内の CADM1 発現分布を比較した。培養細胞において、GR5+CADM1 の方が CADM1 を強く発現していた。また、GR5+CADM1 腫瘍では腫瘍全体で一様に CADM1 を発現していた。一方で、GR5-Tet-On-CADM1 腫瘍では広範囲ではあるが発現は不均等であった。以上から、CADM1 の腫瘍抑制効果は CADM1 の発現強度と発現分布に依存する可能性が示唆された。また、CADM1 発現誘導腫瘍群で、ゲフィチニブ投与・非投与群の腫瘍全体における CADM1 発現細胞の占有率 (%)を比較した。両者において、CADM1 発現細胞の割合は有意差が認められな

かった(CADM1 陽性細胞率 :8.5% vs 9.9%, $p=0.5637$; Mann-Whitney U test) (図 27)。

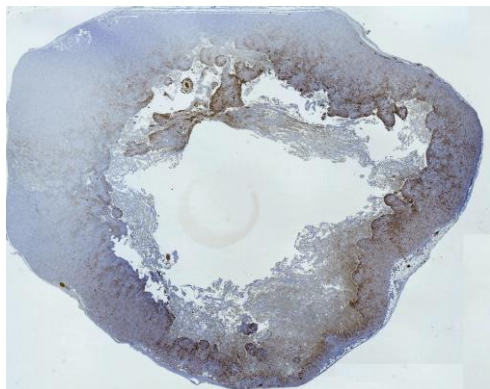
これは、ゲフィチニブ投与群で全体の腫瘍体積が有意に小さく維持されるので、相対的に CADM1 の発現割合が大きくなるためと考えられる。そのためゲフィチニブ併用群では、ゲフィチニブ感受性改善による抗腫瘍効果に加えて、相対的に CADM1 の発現分布も広がり、腫瘍抑制効果が惹起されている可能性も考えられる。以上から、CADM1 の発現をより強く、かつ広範囲に誘導することで、感受性改善に加えて腫瘍抑制効果を誘導しうる可能性が示唆された。具体的には、腫瘍が小さい段階で治療介入することが、効果的な抗腫瘍活性につながる可能性がある。

以上から、動物個体レベルにおいても CADM1 導入によりゲフィチニブ感受性が回復することが示された。そこで、ゲフィチニブ耐性克服にむけて、より応用的な抗腫瘍戦略・耐性克服法を検討することとした。

現在、ゲフィチニブの耐性克服法として多くの試みがなされている。

MET に対しては Tivantinib (ARQ 197) [61, 62]や Crizotinib (PF-2341066)などの MET 阻害薬、HGF に対しては抗 HGF 抗体である Ficlatusumab (AV-299)などが開発されている [63]。これらの薬剤は MET 過剰発現や、HGF 過剰分泌によって EGFR-TKI 耐性を獲得した肺腺がんの耐性を克服し得るとの報告がある [64, 65]。その中で Tivantinib は *in vitro* において、MET 増幅に伴うゲフィチニブ耐性肺腺

Dox(+), ゲフィチニブ(-)



Dox(+), ゲフィチニブ(+)

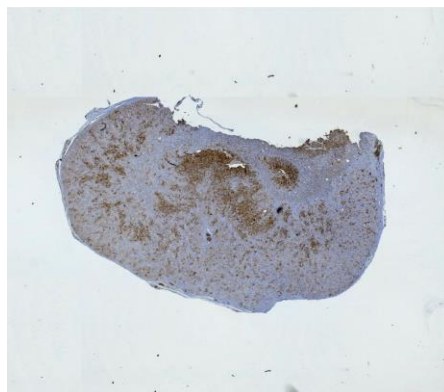


図 27 ;CADM1 発現誘導腫瘍群におけるゲフィチニブ投与・非投与群の CADM1 の発現誘導率

ドキシサイクリン投与により CADM1 の発現を誘導した腫瘍群において、ゲフィチニブ投与・非投与により CADM1 発現細胞数が変化するか検討した。採取した腫瘍検体を免疫染色(抗 CADM1 抗体)したのち、ImageJ ソフトを用いて解析した (×4)。解析方法は全体の面積における、抗 CADM1 抗体陽性領域(茶色)の割合を比較した。

がんの有効と考えられた。そこで、エルロチニブ+Tivantinib 併用 vs エルロチニブ+プラセボ群における第3相試験が行われ、Tivantinib 併用群において、無増悪生存期間を延長することが示された [66]。しかし、近年では Tivantinib は微小管阻害効果を有するとの報告があり、MET 阻害による効果とするには疑問が残る [67]。また Crizotinib に関しては、gatekeeper mutation、ALK 遺伝子増幅などの耐性獲得の報告がある [68,69]。

このように、阻害剤、抗体を用いた治療はいまだ多くの問題を抱えている。その中で CADM1 導入による治療は異なるアプローチであり、新たな戦略として注目される。

CADM1 による治療効果を検討するためには、CADM1 を強制発現させる必要がある。非ウィルスベクター (プラスミド、バクテリアベクター)を用いた遺伝子導入方法では、発現効率が低いことが問題となる。そこで、ウィルスベクターによる遺伝子導入に着目した。

本研究においてはウィルスベクターの中で、アデノウィルスベクターを使用した。がん治療は膠原病治療等と異なり、長期的でなく短期的な戦略として考慮する必要がある。そこで、アデノウィルスは細胞の分裂状態を問わず目的遺伝子を発現させ、更に短期的に高い発現を得ることができるため非常に有用と考えられた。またアデノウィルス自体の殺細胞効果も、抗腫瘍戦略上の利点であった。

一方で、アデノウィルスを用いるうえで問題点は、複数回のウィルス曝露による抗アデノウィルス抗体の産生である。これにより、発現期間が短縮してしまうことがある。これは、免疫応答によることが知られている [70-73]。しかし現在では、薬剤を用いた免疫制御、免疫寛容の誘導、抗原性の低いベクターの開発などが進められており、今後十分に解決し得る問題である。

次に、ウィルスベクターによる実験的な遺伝子治療モデルを確立するうえで、投与方法・経路、投与頻度、投与量を検討した。1) 投与方法 :一般的に投与方法・経路には、尾静脈注射、腹腔内注射、腫瘍内注射がある。尾静脈注射、腹腔内注射は全身投与ではあるが、多くのアデノウィルスは肝臓に集約される [74, 75]。そのため、標的部位 (皮下腫瘍)において、目的遺伝子の発現を調整することが困難と考えた。そこで本研究ではアデノウィルスベクターを腫瘍内に直接注射することで **CADM1** の導入を行なった。結果として、標的部位に発現させることができ、また発現分布をウィルス濃度依存的に調整することが可能であった。2) 投与頻度 :短期的な発現であるため、発現を持続させるため複数回注射することとした。3) ウィルス投与濃度 :先行研究において、A549 腫瘍に **Ad-TSLC1 /CADM1** を腫瘍内注射することで、アポトーシスを誘導し腫瘍が縮小したとの報告がある [76]。今回の研究目的は、ゲフィチニブ耐性肺腺がん腫瘍にアデノウィルスベクターにより **CADM1** を外来性に導入することで、耐性の克

服が可能か否かを調べることである。そのため、Ad-CADM1 投与単独で腫瘍増殖を抑制せず、かつ CADM1 の発現が腫瘍内において維持されるように投与量を調整した。最終的に、ウイルス濃度 5×10^7 ifu の Ad-CADM1 を、3 日ごとに腫瘍内注射することとした。この方法によりゲフィチニブ耐性を克服することができた。

以上から、Ad-CADM1 は 1) アデノウイルスによる殺細胞効果、2) CADM1 による腫瘍抑制効果と 3) ゲフィチニブ感受性改善に伴う抗腫瘍効果など多面的な抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。これは腫瘍内における不均一性を考慮した場合、多面的な治療を同時に行うことが可能となる。

ここで CADM1 による効果が、先行研究でみられた効果と同様の機序であるか検討するためには、CADM1 の各種変異体との比較を行うことが、今後の課題であると考えられる。

現在、肺がんにおける遺伝子治療の分野では、岡山大学らで *p53* 遺伝子発現アデノウイルス Ad5CMV-*p53* (Advexin)を用いて腫瘍内注射を行ない *in vitro*、*in vivo* において有効性が示されている [77-79]。また同ウイルスにて臨床試験も行われており、気管支鏡ガイド下、CT ガイド下の腫瘍内注射に化学療法を併用して著明な腫瘍退縮効果や生存期間の延長を報告している [80-82]。

本研究では、臨床応用の前段階として、ウイルスベクターを用いた CADM1 導

入による実験的な遺伝子治療モデルを確立した。臨床応用を見据えた場合、更に検討すべき点が存在する。

まず、ウィルスベクターに関して、現在では腫瘍特異的に感染するベクターや肝臓での集約を減らすベクターが開発されており、より適切なベクターの選択も可能である。投与方法に関しては、腫瘍内注射を行なう場合、気管支鏡下・CTガイド下または手術時の腫瘍内注射が現実的な投与方法と考えられる。実際、岡山大学でも同様の方法が用いられている。次に、種々の肺腺がん細胞株を用いて、感染後の発現期間・強度を比較することで、臨床における投与頻度とウィルス量を検討する必要がある。

臨床において Ad-CADM1 は、腫瘍内注射といった局所治療に含まれると考えられる。そのため、化学療法や放射線療法と組み合わせた集学的治療の一部として行われることが推察される。そのため、Ad-CADM1 とシスプラチン等の化学療法や放射線療法の併用における感受性の変化を、*in vitro* と *in vivo* において検討する必要がある。

更に、今後より詳細な CADM1 と MET の分子機構を明らかにすることで、CADM1 の責任領域を特定することが考えられる。現在、CADM1 による受容体型チロシンキナーゼ活性化の抑制機構として最も考えられ得るのは、CADM1 の細胞内領域に存在する 4.1 タンパク結合ドメインあるいは PDZ 結合ドメイ

ンの両方に結合する分子が受容体型チロシンキナーゼの細胞内領域に存在するリン酸化部位に作用するメカニズムである。DEP-1 /PTPRJ, LAR /PTPRF, PTP1B, TCPTP 等の PTP (protein tyrosine phosphatase)ファミリーにより、MET のリン酸化が制御されているとの報告があり [83-88]、CADM1 による MET 活性化の抑制にも関与している可能性が十分ある。特に PTPN13 は CADM1 と相互作用することが示されており、MET のリン酸化を抑制する重要な分子として考慮していく必要がある。

こうした CADM1 と MET の分子機構を明らかにすることで、小分子化合物の生成など創薬につながる可能性もある。

また、CADM1 が HGF-MET 経路に対して抑制的に働くことに着目すると、MET 増幅に伴い発生するがんにおいても、Ad-CADM1 は抑制的な働きをすることが考えられる。そのため、MET 増幅により発生するがんの治療方法として、有効である可能性がある。

結論

細胞接着分子 CADM1 が、MET 増幅に起因するゲフィチニブ耐性に対して、動物個体レベルでゲフィチニブ感受性を改善することを示した。更に、実験的な遺伝子治療モデルとして、アデノウィルスベクターを用いて CADM1 をゲフィチニブ耐性腫瘍内に導入することでゲフィチニブ感受性を改善することができた。今後、難航するゲフィチニブ耐性肺腺がんの抗腫瘍戦略において新治療開発の一助となるものと考えられた。

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外科学専攻臓器病態外科学講座呼吸器外科学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癌・細胞増殖部門人癌病因遺伝子分野の村上善則 教授に深く感謝申し上げます。ウィルス実験など、様々な面で御指導御協力頂いた昭和大学腫瘍分子生物学研究所の大場基 講師に深謝申し上げます。またマウスの病理診断など、様々な面で御指導御協力頂いた自治医科大学病理学講座統合病理学部門の松原大祐 准教授に深謝申し上げます。

そして、日々の研究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癌・細胞増殖部門人癌病因遺伝子分野の坂本毅治 助教、伊東剛 助教、坪井裕見 博士、増田智子 氏、市原博美 氏、中岡寛樹 氏、熊谷友紀 氏、明石健 氏、金谷淳志 氏に感謝申し上げます。

参考文献

1. Katanoda K, Hori M, Matsuda T, Shibata A, Nishino Y, Hattori M, Soda M, Ioka A, Sobue T, Nishimoto H: An updated report of the trends in cancer incidence and mortality in Japan. *Jpn.J.Clin.Oncol*; 45: 390-401. 2015
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*; 61: 69-90. 2011
3. 加茂憲一, 金子聡, 吉村公雄, 祖父江友孝: 日本人におけるがん生涯リスク評価. *厚生指標*; 52: 21-26. 2005
4. Wakai K, Inoue M, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Nagata C, Tsugane S; Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan: Tobacco smoking and lung cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiological evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol*; 36: 309-324. 2006
5. Travis WD: Classification of lung cancer. *Semin Roentgenol*; 46: 178-186. 2011
6. Johnson JL, Pillai S, Chellappan SP: Genetic and Biochemical Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Biochem Res Int*; 2012:1-18. 2012
7. 日本肺癌学会編東京: 臨床・病理 肺癌取扱い規約 第7版. 2010
8. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C,

Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, Fulton L, Fulton RS, Zhang Q, Wendl MC, Lawrence MS, Larson DE, Chen K, Dooling DJ, Sabo A, Hawes AC, Shen H, Jhangiani SN, Lewis LR, Hall O, Zhu Y, Mathew T, Ren Y, Yao J, Scherer SE, Clerc K, Metcalf GA, Ng B, Milosavljevic A, Gonzalez-Garay ML, Osborne JR, Meyer R, Shi X, Tang Y, Koboldt DC, Lin L, Abbott R, Miner TL, Pohl C, Fewell G, Haipek C, Schmidt H, Dunford-Shore BH, Kraja A, Crosby SD, Sawyer CS, Vickery T, Sander S, Robinson J, Winckler W, Baldwin J, Chirieac LR, Dutt A, Fennell T, Hanna M, Johnson BE, Onofrio RC, Thomas RK, Tonon G, Weir BA, Zhao X, Ziaugra L, Zody MC, Giordano T, Orringer MB, Roth JA, Spitz MR, Wistuba II, Ozenberger B, Good PJ, Chang AC, Beer DG, Watson MA, Ladanyi M, Broderick S, Yoshizawa A, Travis WD, Pao W, Province MA, Weinstock GM, Varmus HE, Gabriel SB, Lander ES, Gibbs RA, Meyerson M, Wilson RK: Somatic mutations affect key pathway in lung adenocarcinoma. *Nature*; 455:1069-1075. 2008

9. Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*; 511: 543-550. 2014
10. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T: Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*; 6: 4055-4063. 2000

11. Mogi A, Kuwano H: TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J. Biomed Biotechnol*; 2011: 1-9. 2011
12. 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*; 106: 1751-1758. 2006
13. 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*; 27: 427-430. 2001
14. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*; 19:3159-3167. 2000
15. Carpenter G, Cohen S: Epidermal growth factor. *J Biol Chem*; 265: 7709-7712. 1990
16. Wells A: The epidermal growth factor receptor and ligands. *Cancer Treat Res*; 47:143-168. 1989
17. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 127-137. 2011

18. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly J.M, Hynes N.E: ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. EMBO J; 16: 1647-1655. 1997
19. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-sagi D, Schlessinger J: The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. Cell; 70: 431-442. 1992
20. 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; 304: 1497-1500. 2004
21. 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; 350: 2129-2139. 2004
22. 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*; 361: 947-57.

2009

23. Han JY, Park K, Kim SW, Lee DH, Kim HY, Kim HT, Ahn MJ, Yun T, Ahn JS, Suh C, Lee JS, Yoon SJ, Han JH, Lee JW, Jo SJ, Lee JS: First-SIGNAL: first-line single-agent irressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol*; 30:1122-8. 2012
24. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, Gemma A, Harada M, Yoshizawa H, Kinoshita I, Fujita Y, Okinaga S, Hirano H, Yoshimori K, Harada T, Ogura T, Ando M, Miyazawa H, Tanaka T, Saijo Y, Hagiwara K, Morita S, Nukiwa T; North-East Japan Study Group: Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*; 362:2380-8. 2010
25. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M; West Japan Oncology Group: Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*; 11: 121 -128. 2010

26. Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y: Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer. *Int J Clin Oncol*; 11:190-198. 2006
27. 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*; 3: 75ra26. 2011
28. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, Kris MG, Miller VA, Ladanyi M, Riely GJ: Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*; 19: 2240-2247. 2013
29. 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*; 352: 786-792. 2005
30. 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*; 316:

1039-1043. 2007

31. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM: A multifunctional docking sites mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*; 77: 261-271. 1994
32. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF: MET receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adaptor proteins. *Oncogene*; 19: 5582-5589. 2000
33. Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W: Interaction between Gab1 and the c-MET receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*; 384: 173-176. 1996
34. 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*; 277: 31014-31019. 2002
35. Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, Satoh K, Takeuchi M, Imai T, Monden M, Takai Y: Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem*; 278: 35421-35427. 2003

36. Fukuhara H, Masuda M, Yageta M, Fukami T, Kuramochi M, Maruyama T, Kitamura T, Murakami Y: Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of *Drosophila* tumor suppressor Dlg. *Oncogene*; 22: 6160-6165. 2003
37. 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*; 83: 1175-1183. 2003
38. 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*; 107: 53-59. 2003
39. Goto A, Niki T, Chi-Pin L, Matsubara D, Murakami Y, Funata N, Fukayama M: Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex and prognostic significance. *Cancer Sci*; 96: 480-486. 2005
40. 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*; 280: 42164-42171. 2005
41. 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)

42. 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 東京大学大学院医学系研究科博士論文, 2013(未公刊)
43. 室井正謙: 非小細胞肺がんにおける細胞接着分子 CADM1 と MET とのクロ
ストーク 東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文 2014(未公刊)
44. Koizumi F, Shimoyama T, Taguchi F, Saijo N, Nishio K: Establishment of a non-
small cell lung cancer cell line resistant to gefitinib. *Int J Cancer*; 116: 36-44. 2005
45. 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*; 5: 11-18. 1990
46. 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*; 131:1111-1116. 2011
47. Sofocleous CT, Garg SK, Cohen P, Petre EN, Gonen M, Erinjeri JP, Downey
RJ, Travis WD, Solomon SB: Ki67 is an independent predictive biomarker of cancer
specific and local recurrence-free survival after lung tumor ablation. *Ann Surg Oncol*;
20: S676–S683. 2013
48. Tabata K, Tanaka T, Hayashi T, Hori T, Nunomura S, Yonezawa S, Fukuoka J: Ki-

67 is a strong prognostic marker of non-small cell lung cancer when tissue heterogeneity is considered. *BMC Clin. Pathol*; 13: 14-23. 2014

49. Warth A, Cortis J, Soltermann A, Meister M, Budczies J, Stenzinger A, Goeppert B, Thomas M, Herth FJ, Schirmacher P, Schnabel PA, Hoffmann H, Dienemann H, Muley T, Weichert W: Tumor cell proliferation (Ki-67) in non-small cell lung cancer: a critical reappraisal of its prognostic role. *Br J Cancer*; 111: 1222–1229. 2014
50. Jakobsen JN, Sørensen JB: Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*; 79: 1-7. 2013
51. Li HL, Li S, Shao JY, Lin XB, Cao Y, Jiang WQ, Liu RY, Zhao P, Zhu XF, Zeng MS, GuanZZ, HuangW: Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intratumoral injection of an adenovirus encoding endostatin in patients with advanced tumors. *Gene Ther*; 15:247-256. 2008
52. Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, Ichinose Y, Kobayashi K, Takeda K, Kiura K, Nishio K, Seki Y, Ebisawa R, Shahidi M, Yamamoto N: LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both. *J Clin Oncol*; 31: 3335-3341. 2013

53. Walter AO, Sjin RT, Haringsma HJ, Ohashi K, Sun J, Lee K, Dubrovskiy A, Labenski M, Zhu Z, Wang Z, Sheets M, St Martin T, Karp R, van Kalken D, Chaturvedi P, Niu D, Nacht M, Petter RC, Westlin W, Lin K, Jaw-Tsai S, Raponi M, Van Dyke T, Etter J, Weaver Z, Pao W, Singh J, Simmons AD, Harding TC, Allen A: Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. *Cancer Discov*; 3:1404-1415. 2013
54. Sequist LV, Soria JC, Goldman JW, Wakelee HA, Gadgeel SM, Varga A, Papadimitrakopoulou V, Solomon BJ, Oxnard GR, Dziadziuszko R, Aisner DL, Doebele RC, Galasso C, Garon EB, Heist RS, Logan J, Neal JW, Mendenhall MA, Nichols S, Piotrowska Z, Wozniak AJ, Raponi M, Karlovich CA, Jaw-Tsai S, Isaacson J, Despain D, Matheny SL, Rolfe L, Allen AR, Camidge DR: Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 372:1700-1709. 2015
55. Tan CS, Gilligan D, Pacey S: Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*; 16:e4474-59. 2015
56. 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*; 20: 4292-4302. 2002
57. 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*; 350: 2129-2139. 2004
58. Chen Y, Wang M, Zhong W, Zhao J: Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of Gefitinib in a mouse model of non-small-cell lung carcinoma with brain metastasis. *Lung Cancer*; 82: 313-318. 2013
59. Haura EB, Sommers E, Song L, Chiappori A, Becker A: A pilot study of preoperative gefitinib for early stage lung cancer to assess intratumor drug concentration and pathways mediating primary resistance. *J Thorac Oncol*; 5:1806-1814. 2010
60. Nakamura Y, Sano K, Soda H, Takatani H, Fukuda M, Nagashima S, Hayashi T, Oka M, Tsukamoto K, Kohno S: Pharmacokinetics of gefitinib predicts antitumor activity for advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*; 5: 1404–1409. 2010
61. Eathiraj S, Palma R, Volcknova E, Hirschi M, France DS, Ashwell MA, Chan TC: Discovery of a novel mode of protein kinase inhibition characterized by the

- mechanism of inhibition human mesenchymal-epithelial transition factor (c-MET) protein autophosphorylation by ARQ197. *J Biol Chem*; 286: 20666-20676. 2011
62. Munshi N, Jeay S, Li Y, Chen CR, France DS, Ashwell MA, Hill J, Moussa MM, Leggett DS, Li CJ: ARQ197, a novel and selective inhibitor of the human c-MET receptor tyrosine kinase with antitumor activity. *Mol Cancer Ther*; 9: 1544-1553. 2010
63. Feng Y, Thiagarajan PS, Ma PC: MET signaling: novel targeted inhibition and its clinical development in lung cancer. *J Thorac Oncol*; 7: 459-467. 2012
64. 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*; 17: 77-88. 2010
65. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Nanjo S, Ishikawa D, Sano T, Kita K, Nakamura T, Matsumoto K, Suda K, Mitsudomi T, Sekido Y, Uenaka T, Yano S. Combined therapy with mutant-selective EGFR inhibitor and Met kinase inhibitor for overcoming erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Mol Cancer Ther*; 11: 2149-2157. 2012

66. Scagliotti G, von Pawel J, Novello S, Ramlau R, Favaretto A, Barlesi F, Akerley W, Orlov S, Santoro A, Spigel D, Hirsh V, Shepherd FA, Sequist LV, Sandler A, Ross JS, Wang Q, von Roemeling R, Shuster D, Schwartz B: Phase III Multinational, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Tivantinib (ARQ 197) Plus Erlotinib Versus Erlotinib Alone in Previously Treated Patients With Locally Advanced or Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*; 33: 2667-2674. 2015
67. Katayama R, Aoyama A, Yamori T, Qi J, Oh-hara T, Song Y, Engelman JA, Fujita N: Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition. *Cancer Res*; 73: 3087-3096. 2013
68. Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, Laudenslager M, Rappaport EF, Wood AC, McGrady PW, Hogarty MD, London WB, Radhakrishnan R, Lemmon MA, Mossé YP: ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell*; 26: 682–694. 2014
69. Tucker ER, Danielson LS, Innocenti P, Chesler L: Tackling Crizotinib Resistance: The Pathway from Drug Discovery to the Pediatric Clinic. *Cancer Res*; 75: 2770-2774. 2015

70. Barr D, Tubb J, Ferguson D, Scaria A, Lieber A, Wilson C, Pekins J, Kay MA:
Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse
hepatocytes in vivo: comparisons between immunocompetent and immunodeficient
inbred strains. *Gene Ther*; 2: 151-154. 1995
71. Lieber A, He CY, Kirillova I, Kay MA: Recombinant adenoviruses with large
deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties
compared with first-generation vectors in vitro and in vivo. *J Virol*; 70: 8944-8960.
1996
72. Lieber A, He CY, Meuse L, Schowalter D, Kirillova I, Winther B, Kay MA: The role
of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after
infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol*; 71: 8798-8807. 1997
73. 水口裕之、早川堯夫: アデノウィルスベクターの最近の進歩-免疫反応の制御
を目指した改良型ベクターの開発を中心に-. *蛋白質核酸酵素*; 44; 1999.
74. Engelhardt JF, Yang Y, Stratford-Perricaudet LD, Allen ED, Kozarsky K, Perricaudet
M, Yankaskas JR, Wilson JM: Direct gene transfer of human CFTR into human
bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. *Nat Genet*; 4: 27-34.
1993
75. Mastrangeli A, Danel C, Rosenfeld MA, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M,

- Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG: Diversity of airway epithelial cell targets for in vivo recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J Clin Invest*; 91: 225-234. 1993
76. Lei W, Liu HB, Wang SB, Zhou XM, Zheng SD, Guo KN, Ma BY, Xia YL, Tan WS, LiuXY, WangYG: Tumor suppressor in lung cancer1 (TSLC1) mediated by dual-regulated oncolytic adenovirus exerts significant tumor actions in a mouse model. *Acta Pharmacol Sin*; 34: 531-540. 2013
77. Ohtani S, Kagawa S, Tokunaga N, Umeoka T, Tokunaga N, Tsunemitsu Y, Roth JA, Taya Y, Tanaka N, Fujiwara T: Quantitative analysis of p-53 targeted gene expression and visualization of p-53 transcriptional activity following intratumoral administration of adenoviral p53 in vivo. *Mol Cancer Ther*; 3: 93-100. 2004
78. Zhang WW, Alemany R, Wang J, Koch PE, Ordonez NG, Roth JA: Safety evaluation of Ad5CMV-p53 in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*; 6: 155-164. 1995
79. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Zhang WW, Owen-Schaub LB, Roth JA: Induction of Chemo sensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res*; 54: 2287-2291. 1994
80. Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Connors DG, El-Naggar AK, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri

FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Mack M, Merritt JA, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB Jr, Richli WR, Savin M, Schrump DS, Shin DM, Shulkin A, Walsh GL, Wait J, Weill D, Waugh MK: Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*; 91: 763-771. 1999

81. Nemunaitis J, Swisher SG, Timmons T, Connors D, Mack M, Doerksen L, Weill D, Wait J, Lawrence DD, Kemp BL, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB, Richli WR, Shin DM, Walsh GL, Merritt J, Roth J: Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 18: 609-622. 2000

82. Swisher SG, Roth JA, Komaki R, Gu J, Lee JJ, Hicks M, Ro JY, Hong WK, Merritt JA, Ahrar K, Atkinson NE, Correa AM, Dolormente M, Dreiling L, El-Naggar AK, Fossella F, Francisco R, Glisson B, Grammer S, Herbst R, Huaranga A, Kemp B, Khuri FR, Kurie JM, Liao Z, McDonnell TJ, Morice R, Morello F, Munden R, Papadimitrakopoulou V, Pisters KM, Putnam JB Jr, Sarabia AJ, Shelton T, Stevens C, Shin DM, Smythe WR, Vaporciyan AA, Walsh GL, Yin M: Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral

- delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clinical Cancer Res*; 9: 93-101. 2003
83. Villa-Moruzzi E, Puntoni F, Bardelli A, Vigna E, De Rosa S, Comoglio PM. Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem J*; 336: 235–239. 1998
84. Palka HL, Park M, Tonks NK. Hepatocyte Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Met Is a Substrate of the Receptor Protein-tyrosine Phosphatase DEP-1. *J Biol Chem*; 278: 5728-5735. 2003
85. Kakazu A, Sharma G, Bazan HE. Association of protein tyrosine phosphatases (PTPs)-1B with c-Met receptor and modulation of corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 49:2927-2935. 2008
86. Sangwan V , Paliouras GN, Abella JV , Dubé N, Monast A, Tremblay ML, Park M. Regulation of the Met receptor-tyrosine kinase by the protein-tyrosine phosphatase 1B and T-cell phosphatase. *J Biol Chem*; 283: 34374-34383.2008
87. Machide M, Hashigasako A, Matsumoto K, Nakamura T. Contact inhibition of hepatocyte growth regulated by functional association of the c-Met/hepatocyte growth factor receptor and LAR protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem*; 281:8765-8772. 2008

88. Xu Y , Xia W, Baker D, Zhou J, Cha HC, Voorhees JJ, Fisher GJ. Receptor-type Protein Tyrosine Phosphatase β (RPTP- β) Directly Dephosphorylates and Regulates Hepatocyte Growth Factor Receptor (HGFR/Met) Function. J Biol Chem; 286:15980-15988. 2011