

論文の内容の要旨

論文題目 頭頸部癌ならびに喫煙関連肺腫瘍モデルにおける 細胞接着分子 *CADM1* の意義

明石 健

肺癌による年間死亡者数は世界で 160 万人で、がん死の第 1 位を占める。肺癌は組織学的に小細胞肺癌と非小細胞肺癌の 2 つに大きく分類され、さらに非小細胞肺癌は、腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌などに細分類される。非小細胞肺癌の発生は、気道末梢や肺胞の上皮細胞においてがん遺伝子やがん抑制遺伝子のジェネティックおよびエピジェネティックな異常が積み重なることにより、異型腺腫様過形成、上皮内腺癌を経て浸潤性腺癌へと多段階的に起こることが明らかにされてきた。

CADM1 (*Cell adhesion molecule 1*) は非小細胞肺癌のがん抑制遺伝子で、第 11 染色体長腕に存在する。*CADM1* は接着分子で、その不活化は上皮細胞接着の破綻をきたし浸潤、転移の契機となる。ヒトの肺腺癌の臨床検体では *CADM1* の不活化が約 60%で認められ、予後、臨床病期の進行度、リンパ管浸潤、脈管浸潤と相関する。さらに非小細胞肺癌において、*CADM1* のプロモーター領域のメチル化の頻度が、喫煙指数が 800 以上の症例では 800 未満の症例よりも有意に高いことから、*CADM1* は非小細胞肺癌の中でも喫煙が原因で発生するものにより大きく関与する可能性が示唆されている。

CADM1 はもともと非小細胞肺癌のがん抑制遺伝子として同定されたが、胃癌、子宮頸癌など他のがんにおいても同様に不活化が認められることが報告されている。頭頸部癌は、肺癌と同様に気道上皮を中心に発生し、喫煙を重要なリスク因子とする悪性腫瘍であるが、頭頸部癌に属する上咽頭癌の 38%、ヒトパピローマウイルス陽性中咽頭癌の 50%で *CADM1* のプロモーター領域のメチル化が認められる。このことから *CADM1* は、頭頸部癌においてもがん抑制的に働く可能性が示唆されている。

頭頸部癌は 6 番目に多いがんで、世界での年間死亡者数は 30 万人近い。半数以上が進行癌でみつかって予後不良である。近年、がんの分子生物学的機序の解明に伴い、分子標的薬が様々ながんにおいて治療効果を上げてきており、頭頸部癌においては EGFR 阻害モノクローナル抗体であるセツキシマブの有効性が示され臨床でも使われている。しかし、その効果は限定的であり、頭頸部癌における新たな治療標的をみつけるためにも分子生物学的機序の解明が重要である。

がんの発生および進展の機序を明らかにし、様々な遺伝子がどのように寄与しているかを明らかにするために、動物モデルを用いた様々な研究が行われてきた。本研究では、*CADM1* の喫煙

関連肺癌および頭頸部癌における役割を明らかにするため、それぞれの疾患モデルの野生型および *Cadm1* 欠損マウスを作成し、比較検討を行なった。

喫煙関連肺癌のモデルとしてよく用いられるのが、タバコの煙中に含まれる物質である NNK をマウスやラットに投与する方法である。NNK は代謝的に活性化されて発がん性をもつようになるがん原物質で、 α 水酸化を受けて活性化された α 水酸化体が代謝される際に発生する中間代謝物質が、DNA と反応して DNA 付加体を形成し、がん遺伝子やがん抑制遺伝子に変異をきたすと肺腫瘍を発生する。

本研究では、6週齢の野生型および *Cadm1* 欠損 A/J マウスに 100 mg/kg または 200 mg/kg の NNK を腹腔内に単回投与した。NNK 投与後、18週、24週、30週経過した時点で MRI により肺腫瘍の発生数を計測し、30週での MRI 撮影後に予定解剖を行い、肉眼的に肺腫瘍数を計測した。MRI では肉眼的に確認された腫瘍の 79% を計測でき、MRI 所見と肉眼的所見の相関係数は 0.97 であったことから、MRI は肺腫瘍数の計測に有用であると考えられた。

CADMI は非小細胞肺癌におけるがん抑制遺伝子であることから、*Cadm1* 欠損マウスでは野生型に比べて肺腫瘍の発生数が多いことが予想されていた。しかし予期に反して、発生した肺腫瘍数は、NNK 100mg/kg 投与群においても 200 mg/kg 投与群においても、*Cadm1* 欠損マウスの方が野生型よりも有意に少なかった。病理組織学的解析では、発生した腫瘍には、腺腫と腺癌の 2 種類の組織像を認めたが、それぞれの発生頻度には有意差を認めなかった。

NNK によって誘発される肺腫瘍では、ドライバーとなる遺伝子変異のほとんどが *Kras* の 12 番目のコドンのグリシン (GGT) からアスパラギン酸 (GAT) へと替わるミスセンス変異 (G12D) であると報告されている。そこで、NNK 投与により 12 個の腫瘍発生を認めた野生型マウス、10 個の腫瘍発生を認めた *Cadm1* 欠損マウスの各腫瘍および肺の非腫瘍部より DNA を抽出し、*Kras* 遺伝子変異のホットスポットである 12, 13 および 61 番目のコドンが含まれるエクソン 1 と 2 の塩基配列を解析した。野生型マウスでは発生腫瘍の 83% (10/12) に、*Cadm1* 欠損マウスでは 80% (8/10) に G12D 変異を認め、その頻度に有意差はなかった。他の塩基への変異は認めず、13 および 61 番目のコドンにも変異は認めなかった。肺の非腫瘍部にも変異を認めなかった。

以上より、野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスに発生した肺腫瘍は、病理組織学所見にも *Kras* 遺伝子変異の頻度や様式にも有意差は認めず、発生頻度のみが *Cadm1* 欠損マウスで低いことが明らかとなった。その原因を解明するため、1) NNK の吸収、代謝、排泄 2) DNA 付加体形成や DNA 修復能 に着目して以後の実験を行った。

NNK の体内動態を解析するため、NNK および NNAL の血中濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定した。野生型および *Cadm1* 欠損 A/J マウスに 100 mg/kg の NNK を腹腔内単回投与し、15分、30分、60分、90分、120分、240分経過時点の血中濃度を測定した。NNK の血中濃度は野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで差を認めず、NNAL の血中濃度は、60分、120分経過時点で軽度低下が認められたが、顕著な差は認めなかった。

NNK および NNAL は α 水酸化による代謝的活性化を受けるが、 α 水酸化を受ける炭素はニトロソ基のメチル位とメチレン位の 2 通りある。 α 水酸化体は不安定であり直接定量することが困難なことから、それらが分解されてできる代謝産物の量を定量した。NNK においても NNAL

においても、メチル水酸化は顕著な差がなかったのに対し、メチレン水酸化は *Cadm1* 欠損マウスが野生型の 70%程度に低下していた。このことから *Cadm1* の欠損により NNK および NNAL の α 水酸化のうちメチル水酸化が選択的に抑制された可能性が示唆された。

NNKの α 水酸化はシトクロム P450により行われるが、マウスでは CYP2A4 と CYP2A5 が主として働く。NNK の代謝的活性化への CADM1 の影響を解析するため、肺および肝における *Cyp2a4* と *Cyp2a5* の発現量を測定したが、野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで有意差を認めなかった。

NNK により誘発される DNA 付加体の修復への CADM1 の影響を解析するため、DNA 付加体の除去修復を行う *Mgmt* の発現量を比較した。*Mgmt* の発現は、NNK 非投与時においても NNK 投与後においても野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで有意差を認めなかった。

さらに、*Cadm1* 欠損マウスで肺腫瘍数を減少させる原因となった遺伝子を網羅的に検索するため、野生型および *Cadm1* 欠損マウスの肺の DNA のマイクロアレイ解析を行った。*Cadm1* 欠損マウス 2 匹ともに野生型マウス 2 匹より発現が上昇または低下していた遺伝子 99 個のうち 15 個をシトクロム P450 酵素群が占めていたことから、CADM1 はシトクロム P450 酵素群の発現に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

NNK 投与により発生する DNA 付加体の量を、ヒストン構成タンパク質のリン酸化体である γ H2AX により間接的に解析した。 γ H2AX は元々 DNA 二重鎖切断のマーカーとして用いられていたが、近年、DNA 付加体のマーカーとしても用いることができる可能性が示されている。免疫組織染色およびウェスタンブロット法において *Cadm1* 欠損マウスのほうが野生型マウスよりも γ H2AX の量が少ない傾向を認め、*Cadm1* 欠損マウスでは DNA 付加体の量が少ない可能性が示唆された。

以上のことから NNK 誘発肺腫瘍モデルにおいて *Cadm1* の欠損は、NNK のメチル水酸化を抑制することで DNA 付加体生成減少させ、肺腫瘍発生数を減少させた可能性が示唆された。また、シトクロム P450 酵素群の発現に何らかの影響を与えている可能性も示唆された。

頭頸部癌の動物モデルには、舌にがん細胞株を移植する同所性または異所性移植モデルがよく用いられ、発がんモデルは種類に限られる。4NQO をマウスに経口投与または口腔内塗布すると、角化、炎症性変化、異形成、上皮内癌、浸潤癌などヒトの口腔病変と類似した病変が誘発される。病理組織学的だけでなく、分子生物学的にもヒトの病変と類似していることから、しばしば頭頸部癌のモデルとして用いられる。

本研究では、野生型および *Cadm1* 欠損 C57BL/6 オスマウスに、6 週齢の時点から、4NQO を飲水中に混ぜて 8 週間または 16 週間投与し、口腔や咽頭に病変を発生させた。異形成、上皮内癌、浸潤癌などの腫瘍性病変の他に、過角化や炎症性変化などヒトの口腔病変と肉眼的にも組織学的にも類似した病変が発生し、頭頸部癌のモデルとして有用であることが確認された。

Cadm1 欠損マウスでは舌のみにしか病変は発生せず、病理組織学的には全て異形成であった。野生型マウスでのみ舌以外の部位にも病変が発生し、上皮内癌、浸潤癌、乳頭腫様の 3mm を越える病変を認めたことから、4NQO 誘発口腔咽頭腫瘍モデルにおいて *Cadm1* は、腫瘍の増殖や病理組織学的悪性度において促進的に働く可能性が示唆された。

本研究の結果から、今回用いた化学発癌の 2 つのモデルでは CADM1 ががん促進的に機能す

る可能性が示唆された。化学発癌モデルでは、がんの発生母地となる細胞における遺伝子異常だけでなく、化学物質の体内動態や代謝など様々な要素が関わるのが原因の1つと考えられる。ヒトの発がんにおいても遺伝子異常以外の様々な要素が関わることから、疾患動物モデルを用いる際には、どの部分がヒトの疾患と一致していて、どの部分が異なっているのかを、十分に念頭に置くことが重要であることが再認識された。

CADM1 は、細胞接着分子であると同時にがん抑制遺伝子であり、さらに本研究ではシトクロム P450 酵素群の発現を介して薬物代謝に関与する可能性も示唆された。細胞膜タンパク質である CADM1 が、シトクロム P450 酵素の発現などを修飾する具体的な分子機構については、現時点では不明であるが、さらなる研究によりその機能が明らかにされることが期待される。