

博士論文

細胞接着分子 CADM1 の新規 Dependence Receptor
としての機能の解析

小粥 浩之

目次

	頁
要旨 - - - - -	1
序文 - - - - -	2
方法 - - - - -	18
結果 - - - - -	31
考察 - - - - -	53
謝辞 - - - - -	74
参考文献 - - - - -	75

要旨

細胞接着分子 CADM1 は様々ながんで発現欠如を示し、マウスでの脾臓から肝臓への実験的転移を抑制するがん抑制遺伝子である。また、培養がん細胞に CADM1 の発現を回復させると浮遊・単細胞状態における細胞死を積極的に誘導することが先行研究により示唆された。そこで、本研究ではこの分子機構を解明することを目的とした。CADM1 の相互作用は細胞内シグナル伝達経路を活性化する一方、その相互作用が失われるとアポトーシスを誘導すると仮定すると、CADM1 は接着依存的に細胞に生存と死のシグナルを伝達すると考えられる。CADM1 は細胞内領域に caspase-3/7 認識部位を持ち、*in vitro* では caspase-3 により切断される。そこで CADM1 を高発現する MCF-7 安定発現株を樹立し、浮遊・単細胞状態で培養したところ、CADM1 の caspase 認識配列依存的にアポトーシスが誘導された。また、このアポトーシス誘導は CADM1 の caspase-7 による認識配列の切断の有無に依存した。さらに、CADM1 細胞内領域のうち caspase 切断部位より C 末端側の断片に細胞死誘導活性が限定された。以上の性質は、リガンド存在下では細胞の生存に働くが、リガンド非存在下では caspase を活性化することにより細胞のアポトーシスを誘導する Dependence Receptors の性質と共通する。トランス結合した CADM1 をリガンド、かつ受容体と考えると、CADM1 の相反する二つの機能、すなわち接着時における上皮細胞の生存・形態形成と、剥離時におけるアポトーシスの誘導から、CADM1 は新しいタイプの Dependence Receptor と捉えることができる。この分子機構を介して、CADM1 は、がん細胞の浸潤、転移を抑制すると考えられる。

序文

がんは日本人の死因の約 3 割を占めており、中でも肺がんは男女共にがんによる死因の上位に位置する。肺がんの約 8 割が非小細胞肺がん (NSCLC) であるが、所属研究室では NSCLC の新規がん抑制遺伝子として *Cell adhesion molecule 1* (CADM1) を同定した (図 1A)^{1,2}。CADM1 は 442 アミノ酸からなる 1 回膜貫通型の免疫グロブリンスーパーファミリー (IGSF) 細胞接着分子であり、脳、精巣、肺などの組織で強い発現が認められる。CADM1 は細胞外領域に 3 つの免疫グロブリン様ループを持ち、上皮細胞においてホモ二量体を形成し、さらに隣接する上皮細胞の CADM1 とトランス結合を形成する (図 1B (a))³。また、細胞外領域の Ig ループには 6 つの N - 型糖鎖修飾部位、さらに細胞膜直上の部位には 3 種のスプライシングバリエントが存在し、エクソン 8 には 17 か所、エクソン 9 には 4 か所の O - 型糖鎖修飾部位の存在が予測されている。脳・神経ではエクソン 8-10 を持たない 8(-) 型、上皮・ATL ではエクソン 8 を持つ 8 型、精巣では 8 型およびエクソン 8 と 9 を持つ 8/9 型が主に発現する。一方、CADM1 の細胞内領域は 46 アミノ酸から成り、蛋白質間相互作用に重要な FERM 結合領域およびクラス 2 の PDZ 結合領域が存在する。CADM1 は FERM 結合領域を介してアクチン結合性タンパク質である 4.1B / DAL-1 と結合する⁴。さらに 4.1B は、スペクトリン・アクチン結合ドメインを介してアクチン細胞骨格と相互作用する⁵。また、CADM1 は PDZ 結合モチーフを介して、細胞の極性形成に関わる膜結合性グアニレートキナーゼ (MAGuKs) 分子群に属する MPP1-3、CASK、Pals2、syntenin 等のタンパク質と結合する^{6,9}。さらに最近の研究では、CADM1 はトランス・ホモフィリック相互作用を形成して MAGuKs 分子

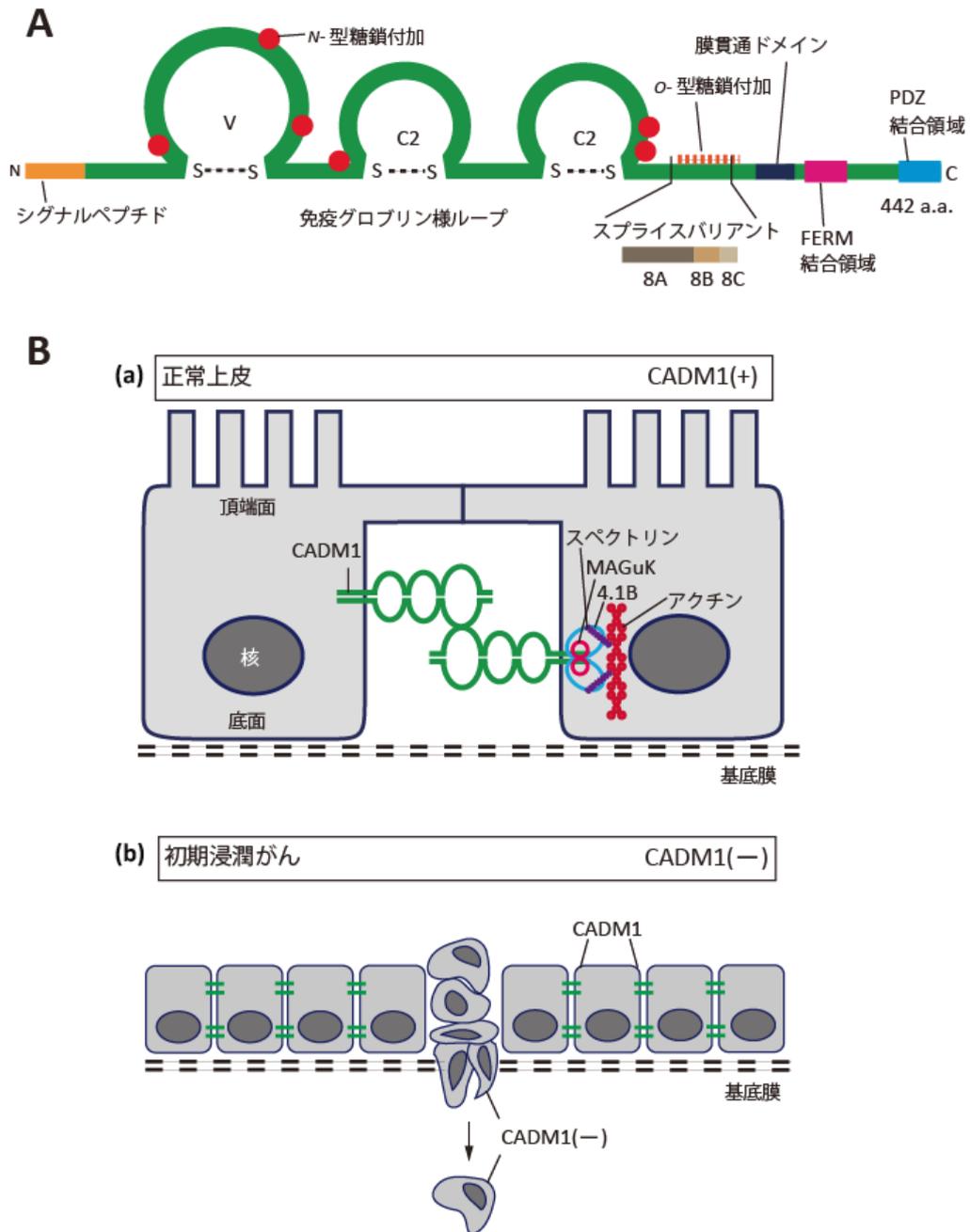


図 1. CADM1 タンパク質の構造と極性上皮における CADM1 の役割

(A) CADM1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、442 アミノ酸から成る。細胞外領域は 3 つの免疫グロブリン様ループから成り、N-型糖鎖付加部位が 6 か所存在する。細胞内領域は 46 アミノ酸から成り、FERM 結合領域、PDZ 結合領域を含む。(B) 正常上皮では CADM1 はホモ二量体を形成し、隣接細胞の CADM1 ホモ二量体とトランス結合を形成する。細胞内領域では FERM 結合領域、PDZ 結合領域を介してそれぞれ 4.1B/DAL-1、MAGuK 群と三者複合体を形成し、細胞接着、上皮構造の維持に働く (a)。一方、接着を失った初期浸潤がんでは CADM1 の発現が欠如する (b)。

群に属する MPP3, Dlg と三者複合体を形成し、PI3K を活性化することによりアクチン細胞骨格の再構成や上皮構造の維持に関与することも報告されている¹⁰。このように、CADM1 は細胞外ではトランス - ホモフィリック結合を形成する一方、細胞内では 4.1B、MAGuK と三者複合体を形成することにより、上皮構造の形成・維持に関与する。これら既に確立された CADM1 の細胞接着への役割に加え、NK 細胞や CD8⁺T 細胞に発現する class I-restricted T cell-associated molecule (CRTAM) とも相互作用することから、がん細胞では CADM1 発現が欠如することにより免疫監視機構からの回避を促進するとの報告もある¹¹⁻¹³。CADM1 のこのように実に多様な働きを持っているが故に、TSLC1, IGSF4A, RA175, SgIGSF, SynCAM1, Necl-2 など、その機能に応じた多くの名称を持つ^{3,6,7,14,15}。

NSCLC をはじめとし、乳がん、子宮頸がん、胃がんなど上皮細胞由来のがんにおいてその進展に伴い CADM1 の発現欠如が認められる¹⁶⁻²²。一般に、ヒト非小細胞肺がんの多段階発がんモデルは、上皮細胞に *KRAS* 変異、*EGFR* 変異、*EML4-ALK* 融合などが起こり、上皮内がんを経て浸潤性腺がんへと発展する。*CADM1* の不活化は、*Tp53* 不活化、*c-MET* 不活化、*4.1B* 不活化と共に浸潤性腺がんを高頻度に認められる (図 1B (b))²³。またその不活化の原因はアレルの欠失、あるいはプロモーターメチル化によるものであることが報告されており、特に非小細胞肺がんでは 44%、子宮頸がんでは 58%、乳がんでは 33% のプロモーターメチル化による不活化が見られる²⁴。また、乳がんでは *CADM1* と *4.1B / DAL-1* の発現が共に欠如することによりがんの浸潤・転移が進展することも報告されている^{18,19}。一方、成人 T 細胞白血病 (ATL) や小細胞肺がん (SCLC)

などのがんでは CADM1 が高発現しており、血管内皮細胞上の他の分子とのヘテロフィリックな接着を介して、その浸潤性に寄与することが示唆されている^{25,26}。

当研究室の先行研究で、CADM1 の腫瘍抑制能について以下のことが示されている。CADM1 をほとんど発現しない NSCLC 由来の細胞株である A549 細胞に、CADM1 の発現量を正常肺程度に回復させ、ヌードマウス皮下に注入したところ、コントロール A549 細胞と比較して CADM1 発現 A549 細胞では腫瘍形成が抑制された¹。この実験では、 $1 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ という非常に薄い濃度で、剥離させた状態の細胞をヌードマウスに注入した場合に最も腫瘍形成が抑制された。また同様に A549 細胞をヌードマウスの脾臓に注入し、肝臓への実験的転移検討したところ、コントロール A549 細胞では 16 匹中 12 匹で肝臓への実験的転移が確認されたのに対し、CADM1 発現 A549 細胞では 23 匹のマウスいずれも実験的転移が認められなかった⁴。他の報告では、CADM1 を A549 細胞に過剰発現させると、その増殖が抑制されると共にアポトーシスが誘導され、その過程で caspase-3 が活性化されることも示されており、さらに CADM1 がこれらの腫瘍抑制能を發揮するためには、FERM および PDZ 結合領域を含む細胞内領域の全域が重要であることも示されている²⁷。以上の知見から、CADM1 は細胞 - 細胞間の接着を促進する接着分子として機能するのみならず、細胞 - 細胞間の接着が失われた場合には剥離した細胞にアポトーシスを誘導する可能性が示唆される。

そこで本研究では、CADM1 が浮遊・単細胞状態で細胞にアポトーシスを誘導する可能性を検討し、その分子機構を解明することを目的とした。この分子機構の解明にあたり着目したのが、

ヒト組織の恒常性を維持し、がんの浸潤・転移を抑制するための安全装置の一つとして提唱されている Dependence Receptor という概念である^{28,29}。Dependence Receptor とは、リガンド存在下では細胞の生存・浸潤・分化といったシグナル伝達経路を活性化するが、リガンド非存在下では単量体となり caspase による切断を受け、その切断断片による細胞のアポトーシスを誘導する受容体の総称である (図 2A)。これまでに、p75^{NTR} - NGF, MET - HGF, RET - GDNF, DCC - netrin-1, UNC5H - netrin-1 など、様々な Dependence Receptors とそのリガンドの組み合わせが発見されている (図 2B, 表 1)。最初に Dependence Receptor として報告されたものは、発生および神経誘導に関与する p75^{NTR} であるが³⁰、p75^{NTR} は後の研究で Dependence Receptor よりも Death Receptor としての機能が注目されるようになった³¹⁻³³。現在、Dependence Receptors の中でも最も研究が進められているものの一つが、大腸がんのがん抑制遺伝子として同定された、CADM1 と同じく IGSF に属する *Deleted in Colorectal Cancer (DCC)* である³⁴。DCC は拡散性のラミニン関連タンパク質である netrin-1 をリガンドとし、軸索伸長や軸索経路探索に関与するとの報告がこれまでに数多くなされている³⁵。この DCC の Dependence Receptor としての生理的意義は主に大腸上皮細胞で考察されており、リガンド存在下では大腸上皮細胞の生存に働くが、リガンド非存在下では腸絨毛先端の細胞にアポトーシスを誘導することにより細胞の寿命を制御し、上皮構造の維持やがん細胞の浸潤・転移の抑制に働くと考えられている^{36,37}。DCC はリガンド存在下では二量体を形成し、細胞内領域では caspase-3 と複合体を形成しているが、リガンド非存在下では DCC は単量体となり、DCC と結合している caspase-3 もしくは他のプロテアーゼによっ

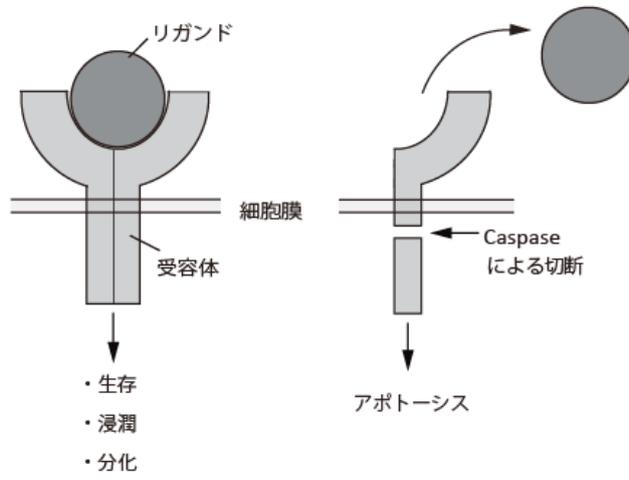
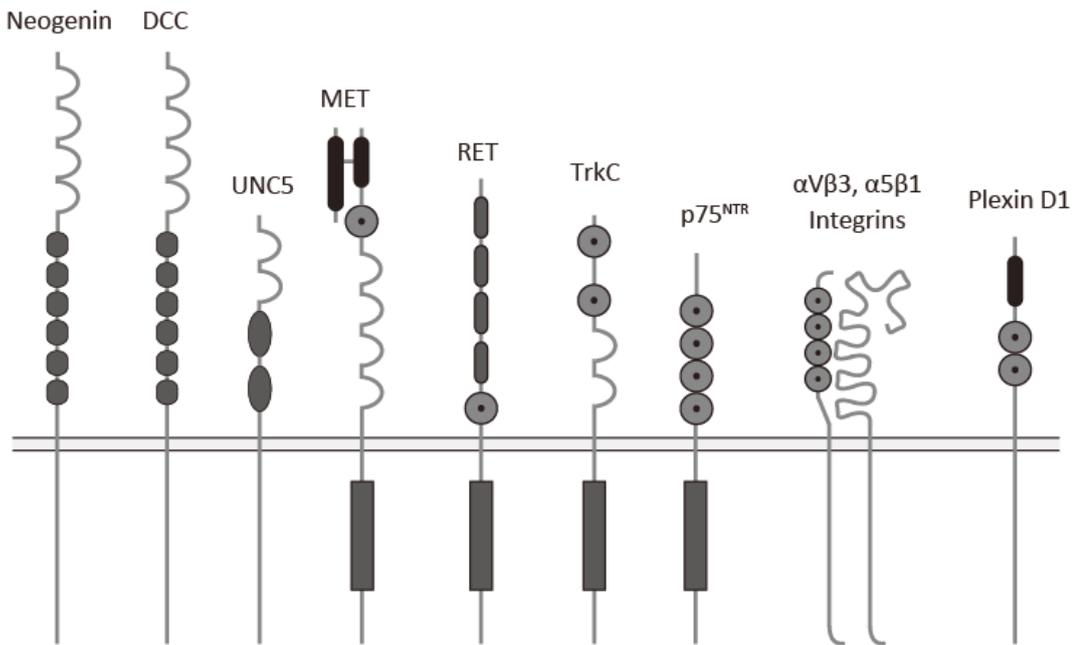
A**B**

図 2. Dependence Receptor は腫瘍抑制に働く

(A) Dependence Receptor とはリガンド存在下では細胞の生存・浸潤・分化などに働くが、リガンド非存在下では単量体となって caspase による切断を受け、その切断断片により細胞にアポトーシスを誘導するという共通の性質を持つ受容体である。(B) これまでに報告された代表的な Dependence Receptors の構造模式図。全ての Dependence Receptors に共通する構造的特徴は見られないが、p75^{NTR} と Integrin を除いてリガンド非存在下では細胞内領域で caspase による切断を受けるといった性質は共通である。CADM1 はこれらのうち、DCC、UNC5 と共に免疫グロブリンスーパーファミリーに属する^{28, 29}。

表 1. 代表的な Dependence receptor とそのリガンドの組み合わせ^{28, 29}

受容体	リガンド
Neogenin	RGMa
DCC	netrin-1
UNC5H	netrin-1
MET	HGF
RET	GDNF
TrkC	NT-3
p75 ^{NTR}	NGF
Integrins	extracellular matrix
Plexin D1	Semaphorin 3E

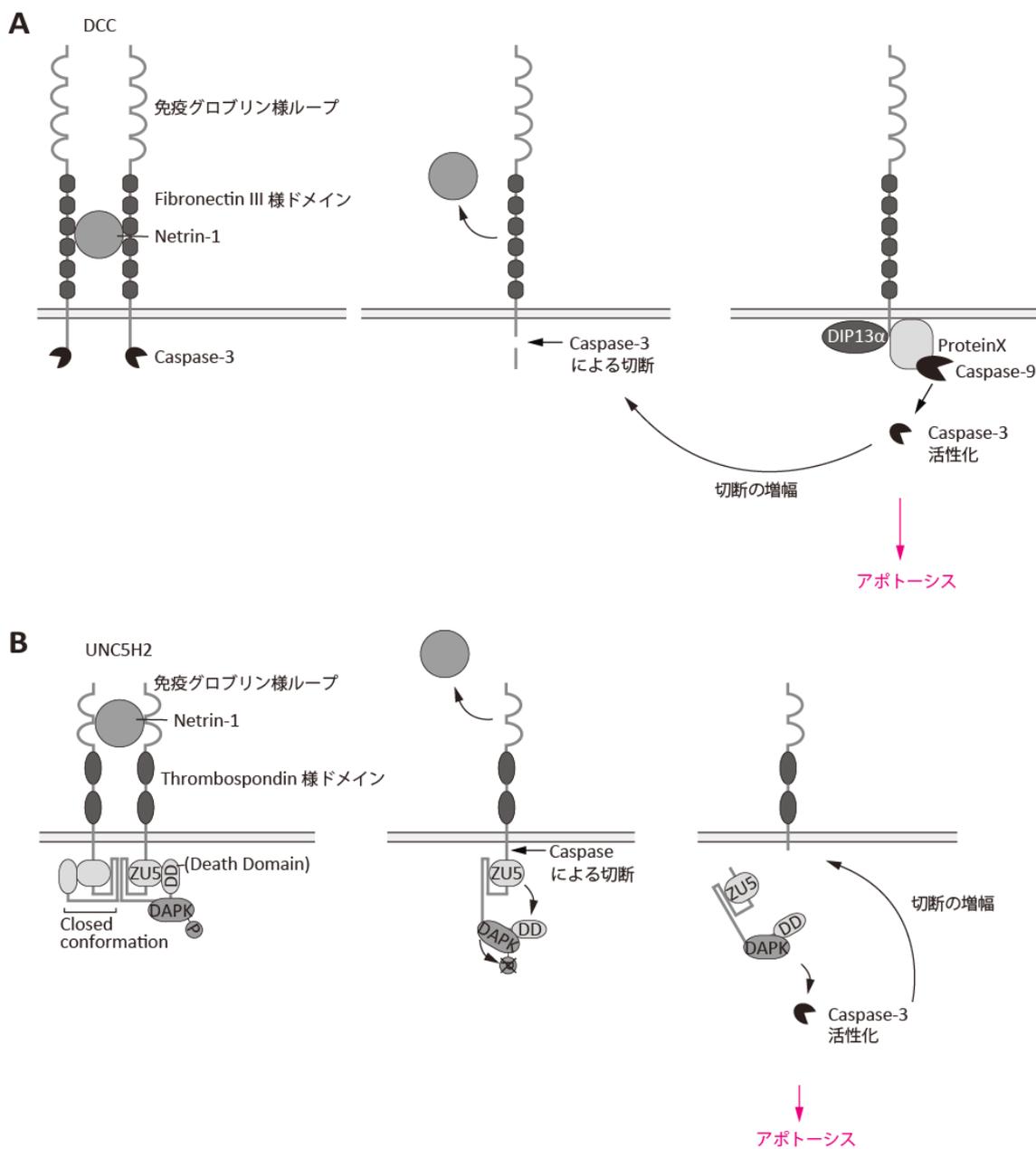


図 3. 代表的な Dependence Receptor である DCC, UNC5H における細胞死誘導の分子機構

(A) DCC はリガンドである netrin-1 存在下では二量体を形成し、細胞内領域では caspase-3 と複合体を形成する。一方、リガンド非存在下では単量体となり caspase-3 などによる切断を受け、DIP13 α などのアダプタータンパク質を介して caspase-9 を活性化し、さらに caspase-3 を活性化することにより DCC 細胞内領域の切断増幅が起こり、アポトーシスが誘導される。(B) UNC5H2 はリガンドである netrin-1 存在下では二量体を形成し、この状態では細胞内領域は closed conformation という安定な構造をとっている。一方、リガンド非存在下では単量体となり、closed conformation が崩壊し、アポトーシス誘導性の DAPK を介して caspase-3 が活性化され、UNC5H2 細胞内領域の切断増幅が起こり、アポトーシスが誘導される²⁸。

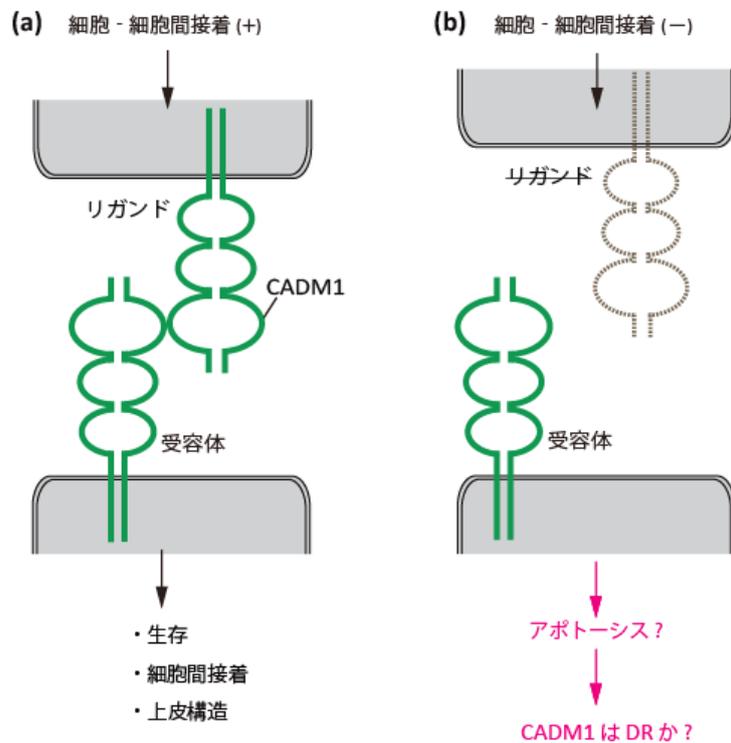


図 4. CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用をリガンド - 受容体の関係と仮定する

CADM1 の相互作用がリガンドかつ受容体として機能することにより細胞の生存、上皮構造の維持、および細胞間接着に働く一方 (a)、その相互作用が失われることにより細胞にアポトーシスを誘導する (b) と仮定すると、CADM1 は全く新しいタイプの Dependence Receptor として働く可能性がある。

て細胞内領域で切断を受ける (図 3A)。切断後は DCC 細胞内領域の N 末端側が露出することにより DIP13a などのアダプタータンパク質と結合し、その直接的あるいは間接的な相互作用を介して caspase-9 を活性化し、最終的に caspase-3 が活性化されることにより DCC の切断増幅が起こり、アポトーシスが誘導されるというモデルが提示されている^{38, 39}。このように、DCC では細胞内領域のうち、切断後の N 末端側が細胞死誘導に重要な領域となる。また UNC5H も netrin-1 をリガンドとする受容体であり、こちらも代表的な Dependence Receptor として広く認識されている⁴⁰。UNC5H も DCC と同様にリガンド存在下では二量体を形成し軸索誘導に関与するが、リガンド非存在下では単量体となり細胞内領域で caspase あるいは他のプロテアーゼによる切断を受け、その C 末端側の断片によりアポトーシスが誘導される。UNC5H が二量体を形成していると細胞内領域の ZU ドメインとデスドメインが相互作用して closed conformation という構造をとり、同じく細胞内領域に結合しているアポトーシス誘導性の DAPK (Death-Associated Protein Kinase) はリン酸化状態で不活化されている(図 3B)。一方、リガンドの解離により単量体となると細胞内領域で切断を受け、ドメインの相互作用が失われて UNC5H のデスドメインと DAPK が相互作用できるようになり、DAPK が脱リン酸化されて活性化されることによりアポトーシスが誘導される^{41, 42}。このように、UNC5H では細胞内領域のうち、切断後の C 末端側が細胞死誘導に重要な領域となる。DCC や UNC5H の発現を欠如している大腸がん細胞では、netrin-1 の解離によって誘導されるアポトーシスが回避される可能性が示唆されている⁴³。

以上、DCC や UNC5H の例に見るように、Dependence Receptors の細胞死誘導の開始点は細胞

内領域が caspase あるいは他のプロテアーゼにより切断を受けることである。しかし、単量体になった場合にのみ切断を受ける分子機構はまだ十分には明らかになっていない。現時点で示唆される分子機構としては、DCC のように二量体を形成している状態で caspase と複合体を形成する Dependence Receptor は、リガンドが解離して単量体となることにより caspase 複合体が崩壊し、caspase 自身の自己切断活性により caspase が活性化することが細胞死誘導の開始シグナルとなることが考えられる。また UNC5H の場合は二量体形成状態では closed conformation をとることにより、caspase や他のプロテアーゼの接近そのものが妨げているが、リガンド非存在下で単量体となることにより安定構造が崩壊すると、プロテアーゼが接近して切断できるようになり、細胞死誘導の開始シグナルとなるものと考えられる。

また、基本的な性質として Dependence Receptor 分子が小胞体上のリボソームで合成された後、ゴルジ体を経て細胞膜へと輸送される過程で、なぜプロテアーゼにより切断を受けて細胞死を誘導しないかということも今後の課題である。この点についてはこれまでに十分に議論されたことはないが、以下のような説明が例として考えられる。一つは、輸送過程は小胞を介するため、小胞に内包された Dependence Receptor 分子にはプロテアーゼが接近できないとする考え方。また図 3 に示したように、Dependence Receptor は切断後の細胞内領域 N 末端側、および C 末端側がアダプタータンパク質や caspase と複合体を形成することにより caspase を活性化するため、輸送過程で複合体を形成していない Dependence Receptor 分子には caspase を活性化する能力はないと考えることもできる。いずれにせよ、このポイントは Dependence Receptors 全般の根本的

問題として更なる説明が待たれるところである。

Dependence Receptors の知見に関しては、リガンドの有無により生存とアポトーシスという正負のシグナルを伝達するという当初の定義に加えて、以下のように数多くのものが報告されている。①リガンド存在下では二量体を形成する、②リガンド非存在下では単量体となる、③細胞内領域に caspase 認識配列が存在する、④caspase あるいは他のプロテアーゼにより細胞内領域で切断を受ける、⑤切断断片によりアポトーシスが誘導される。

CADM1 が単なる接着分子であれば、その発現の回復はむしろ組織への定着に有利に働き、腫瘍原性や転移性を亢進させるようにも思われる。しかし事実が逆であることから、CADM1 の発現回復が浮遊・単細胞状態でのアポトーシスを誘導する可能性が示唆される。CADM1 の相互作用が生存・細胞間接着・上皮構造の維持といった細胞内シグナル伝達経路を活性化する一方、細胞間接着の剥離により CADM1 の相互作用が失われるとアポトーシスを誘導すると仮定すると、CADM1 は互いにリガンドかつ受容体として機能する全く新しいタイプの Dependence Receptor として働くことが考えられる (図 4)。実際に他の Dependence Receptors 同様、CADM1 細胞内領域の FERM 結合領域と PDZ 結合領域の間には caspase-3/7 認識配列 (DAAD) が存在する (図 5A)。DXXD 配列は caspase-2, 3, 7 を含む group II caspase の代表的な認識配列であることから^{44,45}、まず大腸菌に発現させることにより合成・精製したリコンビナント CADM1 (rCADM1) が精製 caspase-3 によって *in vitro* で切断を受けるかどうかを、Université de Lyon, Centre de recherche en cancérologie de Lyon. の Patrick Mehlen 博士らとの先行研究で検討した。その結果、CADM1-

WT tag (-) では caspase-3 処理により、全長 (50 kDa) よりわずかに分子量の小さいサイズのバンド (45 kDa) が検出された (図 5B (a) 左 2 レーン)。また CADM1-YFP (70kDa, C 末端側に YFP タグ付) では、約 45kDa と YFP + CADM1-C 末端側のサイズ (25 kDa) に切断された (図 5B (a) 右 2 レーン)。一方、caspase 認識配列に変異を持つ CADM1-NAAN 変異体では全長直下のバンド (45 kDa) が見られなくなった (図 5B (b))。なお、*in vitro* での切断実験では caspase は本来の認識配列に加えて、配列非特異的な切断活性も示すため、図 5B ではバンドが何本も検出されている。以上から、CADM1 は細胞内の DAAD 配列依存的に caspase-3 による切断が起こることが示された。

当研究室の先行研究により、ヒト子宮頸がん細胞株の HeLa 細胞やヒト大腸がん細胞株の Caco-2 細胞では、CADM1 の発現が浮遊・単細胞状態における細胞死を誘導するとの知見が得られている。プロモーターのメチル化により CADM1 発現を欠如する HeLa 細胞に CADM1 を発現させ、浮遊培養を 8 時間まで行い AnnexinV 陽性細胞の割合を検出した。この実験では細胞を単細胞状態にする操作はせず、細胞は時間経過と共に凝集状態となる培養条件で実験を行った。その結果、コントロール細胞と比較して CADM1 発現細胞は培養開始後に徐々に凝集を始め、ほぼ全ての細胞が凝集状態となった 4 時間経過以降は AnnexinV 陽性細胞の割合に変化は見られなくなった (図 6A)。このことから、CADM1 発現による細胞死誘導には CADM1 同士の相互作用が重要であることが示唆されたため、次に浮遊・単細胞状態での培養を試みた。同様に、HeLa 細胞に CADM1 を発現させ、3 日間通常培養または浮遊・単細胞培養した後、AnnexinV 陽性の早期

アポトーシス細胞の割合を検出した。その結果、通常培養では AnnexinV 陽性細胞の割合に差は見られなかったが、浮遊・単細胞培養ではコントロール細胞と比較して CADM1 発現細胞において AnnexinV 陽性細胞の割合が増加した (図 6B)。以上から、複数の培養細胞に対して CADM1 の発現が、浮遊・単細胞状態での細胞死を誘導する可能性が示唆された。

そこで本研究では、CADM1 が Dependence Receptor として働く可能性、およびその分子機構を詳細に検討するため、乳がん細胞株である MCF-7 細胞を用いて解析を行った。まず、実験的転移過程における浮遊・単細胞状態を模倣する培養条件である浮遊・単細胞培養を用いて、CADM1 細胞内領域の caspase 認識配列依存的にアポトーシスが誘導されるかを検討した。さらに、アポトーシス誘導が CADM1 の caspase による切断に依存するか、また切断を受けた後の CADM1 細胞内領域のうち細胞死誘導に必要な領域がどこにあるかを解析することにより、CADM1 の Dependence Receptor としての可能性を検討した。

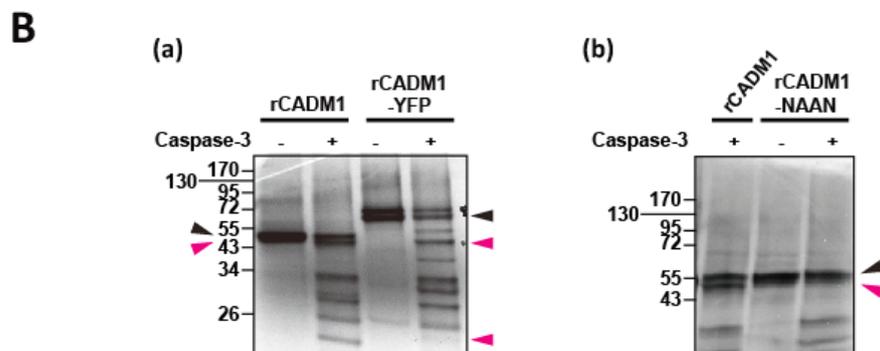
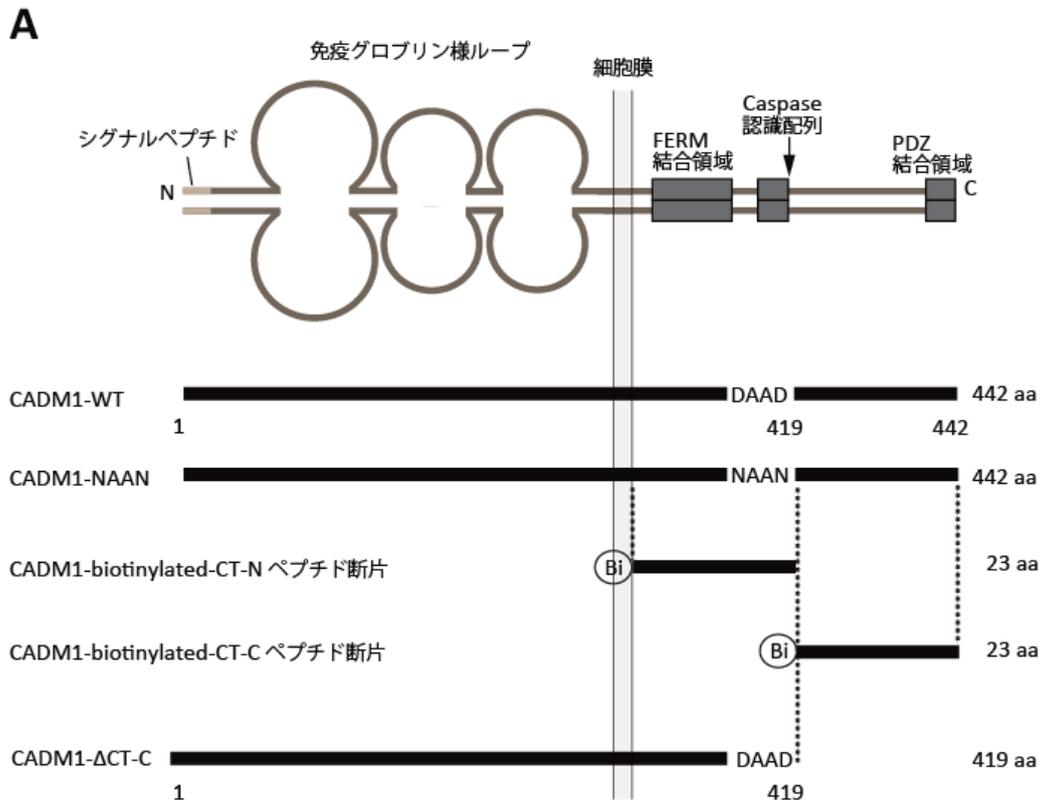


図 5. CADM1 模式図と *in vitro* での CADM1 の caspase-3 による切断

(A) 本研究で用いた CADM1 全長と、変異・欠損型 CADM1、および CADM1 細胞内 (CT) ペプチド断片の模式図。Bi は biotin の略である。(B) 野生型のリコンビナント CADM1 (rCADM1)、CADM1 の C 末端側に YFP タグをつけたリコンビナント CADM1 (rCADM1-YFP)、caspase 認識配列変異型のリコンビナント CADM1 (rCADM1-NAAN) を精製 caspase-3 で切断し、SDS-PAGE で泳動した。黒矢頭は rCADM1 全長を、赤矢頭は rCADM1 の切断後の断片をそれぞれ示している。なお、rCADM1 は糖鎖修飾を受けないので全長が 50 kDa 程度となる。なお、この切断実験は Université de Lyon, Centre de recherche en cancérologie de Lyon. の Patrick Mehlen 博士らとの共同研究である。

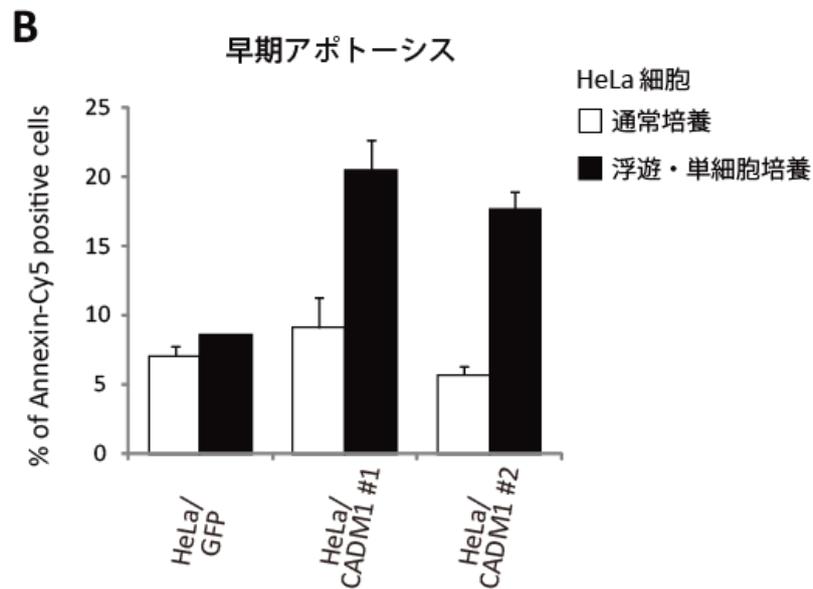
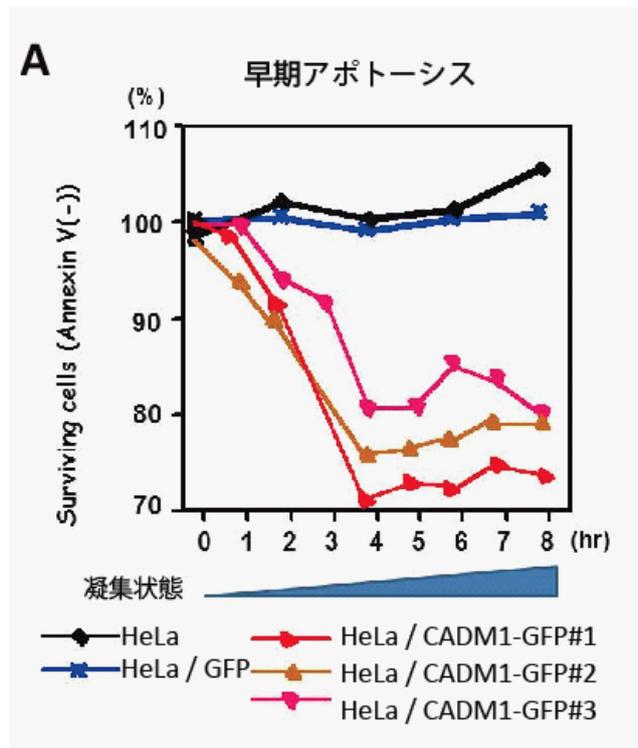


図 6. CADM1 を発現させた HeLa 細胞の浮遊培養と浮遊・単細胞培養

(A) HeLa 細胞に CADM1 を発現させ、浮遊状態で 8 時間培養し、凝集状態の観察と AnnexinV 陽性細胞の割合の測定を行った。(B) HeLa 細胞に CADM1 を発現させ、通常培養または浮遊・単細胞培養を 3 日間行った後、AnnexinV 陽性細胞の割合を測定した。

方法

細胞培養

MCF-7, HEK293細胞はHSRRB (Health Science Resources Bank, 大阪, 日本) から購入した。

MCF-7細胞はE-MEM with L-Glutamine and Phenol Red (和光純薬工業, 大阪, 日本)、HEK293細胞はDMEM Low Glucose (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) に、それぞれ10 % FBS (BioWest社, Nuaille, France)、1 % MEM Non-Essential Amino Acids (Invitrogen社, Carlsbad, CA, USA)、100 units/ml ペニシリンおよび100 µg/ml ストレプトマイシン (Invitrogen社)、またEMEMには1 % Sodium Pyruvate 100 mM (Invitrogen社) を加えた培地にて培養した。全ての細胞はCO₂ 濃度5 % の湿潤したインキュベーター (三洋電気, 東京, 日本) で37 °Cで培養した。継代は培地を除去後、D-PBS (-) (和光純薬工業) で洗浄し、0.05 % Trypsin-EDTA (Invitrogen社) を加えてから37 °C、インキュベーター中に5分間入れて細胞をはがし、培地を加えて希釈したものを新しいプレートにまいた。

次に浮遊・単細胞培養について述べる。培養皿に5 % Agar Noble (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) と温めたEMEM を約1:7.3で混合したものを注ぎ、室温で20分間固める。そこに、通常培地中でよく懸濁し単細胞状態とした当該細胞を 3.0×10^5 cells/mlとなるようにまくことにより浮遊・単細胞状態とした。さらに細胞間の接着を阻害するため、キレート剤であるethylen glycol tetraacetic acid (EGTA) (Sigma-Aldrich社, St. Louis, MO, USA) を終濃度5 mM になるように通常培地中に加え、ピペットによる懸濁を1日1回行った。CADM1-EC-Fcは0.05 µMまたは0.25 µM、コントロール

ールIgGは0.05 μ Mを添加し、以降36時間経過毎に同量ずつ添加して培養した。pan-caspase阻害剤 Z-VAD-FMK (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) はアッセイ開始時に終濃度が20 μ Mとなるように添加し、コントロールとしてZ-VAD-FMKの溶媒であるDMSO (和光純薬工業) を同量添加した。培養後にCADM1細胞内断片をウエスタンブロット解析で検出する際には、プロテアソームによる断片分解を防ぐため、プロテアソーム阻害剤MG132 (株式会社ペプチド研究所, 大阪, 日本) を終濃度10 μ Mとなるように添加し2時間培養した後で回収した。

抗体

蛍光免疫染色法、免疫沈降法、ウエスタンブロット解析に用いた抗体は以下の通りである。ウサギポリクローナル抗体である抗CADM1抗体 (C-18) は、CADM1のC末端の18ペプチドをハプテン、keyhole limpet hemocyanin (KLH) をキャリアーとしてウサギに対して免疫し、アフィニティカラム (旭硝子, 東京, 日本) で精製することにより作製した⁴⁶。同じくウサギポリクローナル抗体である抗CADM1抗体 (No.4) は、CADM1のC末端の20ペプチドを認識し、これはIto Aらが作製したものを使用した⁴⁷。ウサギポリクローナル抗体である抗caspase-7はCell Signaling Technology社 (Denvers, MA, USA) から購入した。マウスモノクローナル抗体である抗GAPDH抗体はMillipore社 (Billerica, MA, USA) から購入した。ヤギポリクローナル抗体である抗マウスIgG-Fc抗体はSigma-Aldrich社から購入した。ウエスタンブロット解析の二次抗体として用いた、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識の抗マウスIgG抗体・抗ウサギIgG抗体はSanta

Cruz Biotechnology社 (Dallas, TX, USA) より購入した。Alexa Fluor 488標識抗ヤギIgG抗体、およびAlexa Fluor 488標識StreptavidinはMolecular Probes社 (Eugene, OR, USA) から購入した。

プラスミドベクターとトランスフェクション

野生型 CADM1 プラスミドベクターは、CADM1 全長 (442 アミノ酸) を pcDNA3.1 / Hygro (+) ベクター (Invitogen 社) の *KpnI* と *NotI* サイトにフレームを合わせて導入したものを使用した¹。また、このとき用いた pcDNA3.1 / Hygro (+) ベクターをコントロールプラスミドベクターとした。Caspase 認識配列変異型である CADM1-NAAN プラスミドベクターは、CADM1 細胞内領域の DAAD 配列が NAAN 配列となるように (D416N, D419N) 変異を入れたプライマー gccaaaggagccgatAacgcagcaAacgcagacacagctataatcaatg と cattgattatagctgtgtctgcgtTtgctgcgTatcggctcctt-ggc を用いて、前述の野生型 CADM1 プラスミドベクターを鋳型として QuickChange site-directed mutagenesis system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で作製した。CADM1 の C 末端側 18 アミノ酸を欠損する CADM1-ΔCT-C は CADM1 の 1-419 アミノ酸を PCR で増幅し、野生型 CADM1 プラスミドベクターと同様に pcDNA3.1 / Hygro (+) (Invitogen 社) ベクターの *KpnI* および *NotI* サイトにフレームを合わせて導入して作製した。CADM1 細胞外領域融合タンパク質 (CADM1-Ec-Fc) 発現プラスミドは、CADM1 の細胞外領域 (1-375 アミノ酸) を PCR 法にて増幅し、東京工業大学、赤池博士より供与を受けた pcDNA3.1-IgG-Fc ベクターの Fc の上流の *EcoRI* および *NotI* サイトにフレームを合わせて挿入した。

トランスフェクションには Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen 社) を用い、各細胞の推奨プロトコルに従った。また MCF-7 安定発現細胞株の樹立のため、トランスフェクション後に 500 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin (Invitrogen 社) を含む培地で 2 週間程度培養を行い、リングを用いてクローンを選別し安定発現株を得た。

RNA 干渉

siRNA のコントロールには ON-TARGETplus siCONTROL (Thermo Fisher Scientific 社, Waltham, MA, USA) を使用した。*caspase-7* に対する siRNA の配列は Hashimoto らの論文を参照し、Sigma-Aldrich 社で合成したものを用いた⁴⁸。トランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用い、推奨プロトコルに従って各 siRNA を 50 μM ずつ細胞に導入した。

ウェスタンブロット解析

細胞に lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 % Triton X-100, 200 μM AEBSF, 10 μM leupeptin, 1 μM pepstatin A, 1 mM DTT] を加えて 4°C で 10 分間溶解し、15000 rpm にて 4 °C で 10 分間遠心し上清を回収した。上清の一部を Protein Assay Reagent (Bio-Rad 社, Hercules, CA, USA) と混合し、Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad 社) で 595 nm における吸光度を測定し、濃度を定量した。上清に 3 \times SDS sample buffer [0.2 M Tris-HCl (pH 6.8) , 30 % glycerol, 6 % SDS, 15 % β -ME, 0.03 % BPB] を加えて 95°C で 5 分間煮沸し、氷上で 3 分間急冷することによ

り試料を得た。濃度10%のゲルを用いてSDS-PAGE electrode buffer [25 mM Tris, 0.2 M Glycine, 0.1 % SDS]、定電流20 mAでSDSポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、フロントダイがゲルの下端より5 mmの所まで達したら泳動を停止した。ブロッティングはセミドライ方式で行い、PVDF膜は最初にメタノール、続いてブロッティングバッファー [50 mM Tris, 40 mM Glycine, 20 % メタノール, 0.1 % SDS] の順に浸してからトランスブロットSDセル (Bio-Rad社) にて定電流100 mAで60分間ブロッティングした。次にPVDF膜を10 % スキムミルク / PBS-T [0.1 % Tween20 / PBS] に浸してブロッティングを行った。一次抗体は10 % スキムミルク / PBS-Tを用いて以下の濃度で希釈し、4°Cで約12時間反応させた。抗CADM1抗体 (C-18) は3000倍希釈、抗CADM1抗体 (No.4) は1000倍希釈、抗caspase-7抗体は3000倍希釈、抗GAPDH抗体は10000倍希釈とした。PBS-Tで3回洗浄した後、二次抗体として各動物種のHRP標識抗IgG抗体を10 % スキムミルク / PBS-Tで5000倍に希釈して加え、室温で約1時間反応させた。PBS-Tで3回洗浄した後、Lumi-Light^{PLUS} (Roche Applied Science社, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) およびFUJI MEDICAL X-RAY FILM (富士フイルム, 神奈川, 日本) を用いて検出を行った。発現量の定量はImageJソフトウェアを用いて行った。

CADM1 の細胞内断片を検出する際には、表 2 の低分子量ゲルを用いた Tricine-SDS-PAGE を行った。ゲルとバッファーの組成をそれぞれ下の表 2・3 に示す。泳動は 4°C、20 mA 定電流で約 5 時間行った。ブロッティングは専用のブロッティングバッファー (表 4) を用いてセミドライ方式で行った。

表 2. Tricine-SDS-PAGE で用いたゲルの組成

分離ゲル	
40(w/v)% アクリルアミド/ビス混合液(29 : 1)	3.1 ml
ゲルバッファー (pH 8.45)	2.5 ml
40 % Glycerol	1.9 ml
10 % APS	25 μ l
TEMED	2.5 μ l
濃縮ゲル	
40(w/v)% アクリルアミド/ビス混合液(29 : 1)	0.32 ml
ゲルバッファー (pH 8.45)	0.77 ml
D.W.	2.1 ml
10 % APS	25 μ l
TEMED	2.5 μ l

表 3. Tricine-SDS-PAGE で用いた陽極・陰極バッファー組成

各 Buffer 1 L あたり	Tris	Tricine	SDS	pH
10×陽極バッファー	242.2 g			8.9 (HCl で調整)
10×陰極バッファー	121.1 g	179.17 g	10 g	8.25 付近 (調整不要)
ゲルバッファー	363.3 g		3 g	8.45 (HCl で調整)

表 4. Tricine-SDS-PAGE で用いたブロッキングバッファー組成

1 L あたり	Tris	Glycine	
10×ブロッキングバッファー	30.28 g	146.39 g	
1 L あたり	10×ブロッキングバッファー	MeOH	D.W.
1×ブロッキングバッファー	100 ml	200 ml	700 ml

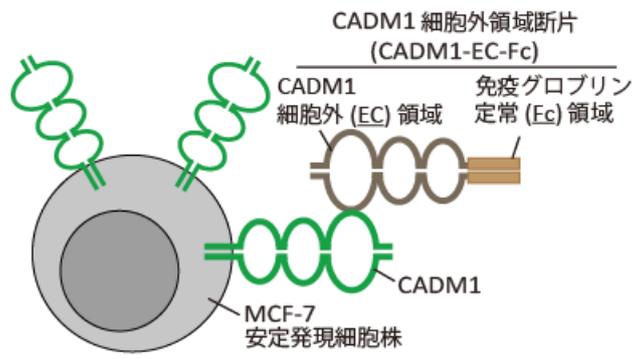
CADM1 細胞外領域融合タンパク質 (CADM1-EC-Fc) の作製

プラスミドの項目で記したCADM1-Ec-Fc発現プラスミドをHEK293細胞に導入し、1000 µg/ml G418を用いたセレクションを行い、CADM1-Ec-Fcを安定発現するHEK293細胞を得た。このHEK293細胞はCADM1の細胞外領域とマウス免疫グロブリンIgGの定常領域 (Fc) を融合したCADM1-Ec-Fcタンパク質を恒常的に発現し、GIT培地 (和光純薬工業) 中で培養すると細胞外に分泌する。まず細胞をGIT培地中でよく混合し、HYPERFlask (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) に撒き込み、2週間程培養した。その後、培養上清をプロテインA 親和性のカラムクロマトグラフィーによって精製し、タンパク質溶液中の緩衝液を透析によりPBSに置換した。その後、Protein Assay Reagent (Bio-Rad社) を用いたタンパク定量による濃度の測定、続く銀染色MSキット (和光純薬工業) を用いた分子量の確認を行った後、1.5 ml チューブに入れて-70°Cで保存した。CADM1-EC-Fcの浮遊・単細胞培養中への添加は先述の細胞培養の項目に記載した通りである。図7Aに培養の模式図を示す。なお先行研究により、このCADM1-EC-Fcを培養皿表面に固相化した上にCADM1発現細胞を重層培養すると、細胞表面のCAMD1とCADM1-EC-Fcとの相互作用により細胞伸長が認められることが明らかになっている¹⁰ (図7B)。

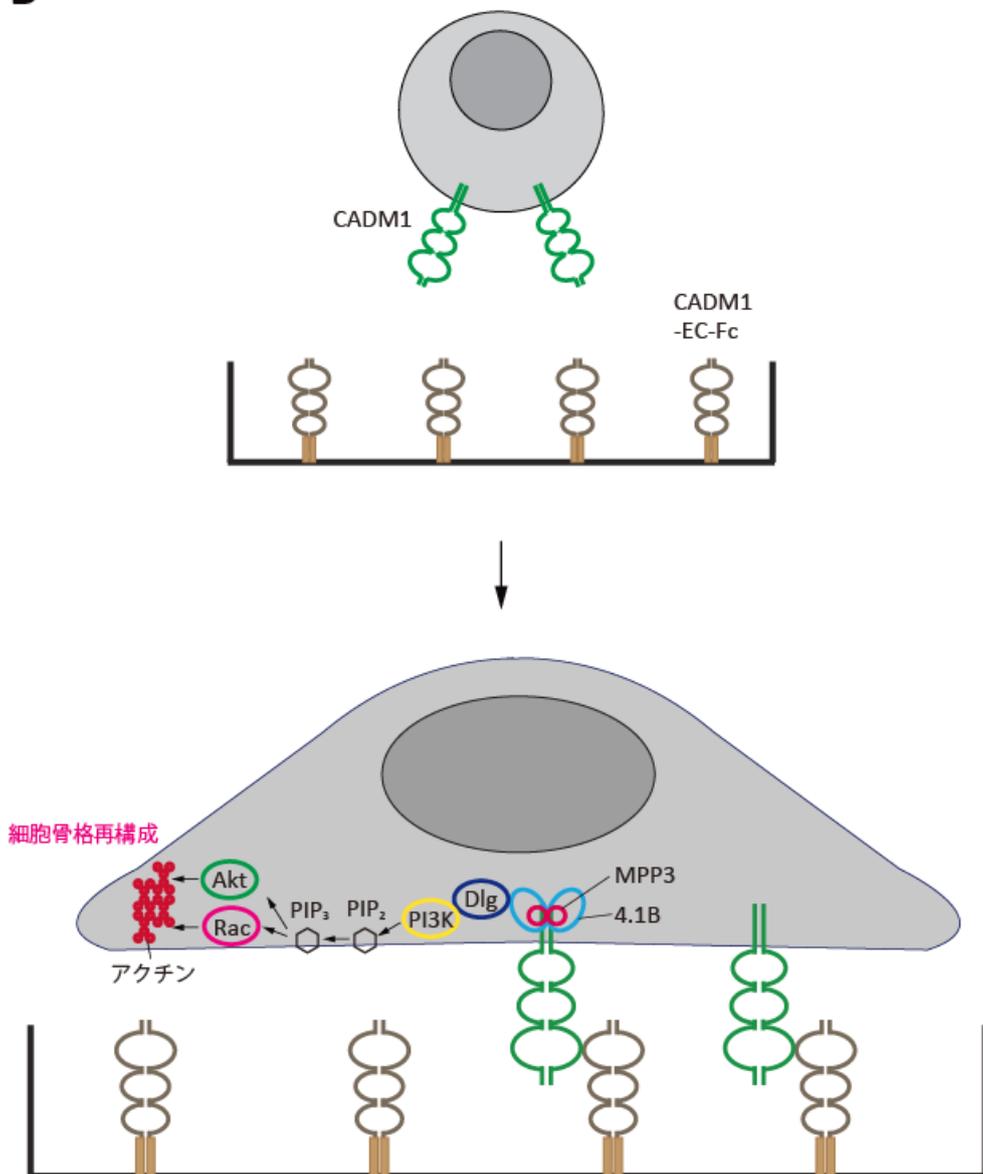
図 7. MCF-7 安定発現細胞株の培養中への CADM1-EC-Fc の添加

(A) CADM1 安定発現細胞株の浮遊・単細胞培養中へ CADM1-EC-Fc を添加し、細胞表面のCADM1 と CADM1-EC-Fc との相互作用を観察、その細胞死誘導への影響を検討した。(B) 細胞表面の CADM1 と培養皿上に固相化された CADM1-EC-Fc との相互作用により、CADM1 細胞内領域の MPP3 複合体に Dlg が結合し、PI3K が細胞膜で活性化される。さらに下流の Akt, Rac の働きを介して細胞骨格再構成に関わることが示されている¹⁰。

A



B



細胞死アッセイ

トリパンブルー排除法は、通常培養または浮遊・単細胞培養後に細胞を回収した後、2000 rpm、3 分間遠心し、上清をアスピレーターで除去した。そこに 500 μ l の PBS を加えて懸濁した後 10 μ l をとり、等量のトリパンブルーを加えて懸濁したものをセルカウント用のプレパラートに注入し、Biozero 蛍光顕微鏡 (KEYENCE, 大阪, 日本) で 3 視野撮影した画像を観察することにより細胞の生存率を測定した。

フローサイトメトリーによるSubG1に含まれる細胞数の測定は、通常培養または浮遊・単細胞培養後に細胞を回収した後、まず2000 rpm、3分間遠心して上清をアスピレーターで除去した。そこに500 μ lのPBSを加えて懸濁し、遠心して上清を除去した。次にPBS/0.1 % azide [Sodium azide 10 % in PBS : D-PBS (-) = 1 : 99] を加えてピペッティングした後、2000 rpm, 3 分間遠心し上清を除去した。その後、この操作を繰り返す。2度目の上清除去では90 μ l 程度残し、そこに100 % エタノール (ナカライテスク社) を210 μ l加えてピペッティングした後、 -20°C で1時間から一晩静置する。その後、PBS/0.1 % azideを900 μ l 加えてピペッティングし、2000 rpm, 3分間遠心し上清を除去し、さらにPBS/0.1 % azideを500 μ l加えて2000 rpm, 3分間遠心し、200 μ l残して上清を除去する。そこに、計700 μ lとなった時点でpropidium iodide (PI) (和光純薬工業) 1 mg /mlが終濃度50 μ g/ml、RNaseAが終濃度100 μ g/mlとなるように調整されたPBS/0.1 % azide 500 μ l加えて、室温で5分間静置した後、FACS Calibur (BD社) での測定を行った。まずFSC (前方散乱光) ・SSC (側方散乱光) を検出して細胞以外のものを除去するようにR1領域を設定し、さらにR1領域内の細胞に

ついてFL2-A (蛍光DNA量)・FL2-W (蛍光パルス幅) を検出してダブレット細胞を除去するようにR2領域を設定した。R2領域の20000細胞についてFL2-AのヒストグラムプロットによりDNA含量の解析を行った。

AnnexinV染色法は、浮遊・単細胞培養後に細胞を回収した後、まず2000 rpm、3分間遠心して上清をアスピレーターで除去した。PBSで懸濁し、回収した細胞を計数して 1.5×10^5 cells分回収した後、PBSを約1 ml 加えて2000 rpm、3分間遠心し、上清を除去した。残ったペレットにAnnexin-binding buffer [10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4]を100 μ l, Alexa Fluor 488 Annexin V (Invitrogen社) を5 μ l、PI 1 mg/mlを1 μ l 加え遮光して室温で15分間放置した。その後、サイトスピン4 (Thermo Fisher Scientific社) で1000 rpm、3分間遠心して細胞をスライドガラス上にはりつけた。Dako Pen (ダコ・ジャパン株式会社, 東京, 日本) で細胞の周りを囲い、4 % paraformaldehyde (PFA) を乗せて遮光して室温で15分間放置した。PBSで1 回洗浄しNH₄Cl / PBS を乗せ、遮光して室温で10 分間放置した。その後、PBSで3 回洗浄し、水分を完全に除いた後、ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen社) を乗せ、カバーガラスで封入したものAxioVision (Carl Zeiss AG社, Oberkochen, Germany) を用いて観察した。

免疫細胞染色

培養細胞を回収後、PBSで洗浄し、サイトスピン4で遠心する操作からのPFA処理、NH₄Cl / PBS 処理と続くPBSでの3回の洗浄までは上記のAnnexin V染色法の項目に同じであり、その後5% FBS

で15分間ブロッキングした。ただし細胞内に導入したCADM1-CTペプチド断片を検出する際には、細胞膜透過処理を施すためにNH₄Cl/PBS処理後にTriton X-100で20分間処理する操作を追加した。CADM1-EC-Fcの検出の際にはヤギポリクローナル抗体である抗マウスIgG-Fc抗体 (1000倍希釈) を一次抗体として20分間反応させてから、二次抗体としてAlexa Fluor 488標識の抗ヤギIgG抗体 (1000倍希釈) を20分間反応させた。また細胞内に導入したCADM1-CTペプチド断片を検出する際には、ペプチド断片N末端のbiotinを検出するためにAlexa Fluor 488標識したStreptavidin (1000倍希釈) で20分間反応させた。その後、PBSで3回洗浄し、水分を完全に除いた後、ProLong Gold antifade reagent with DAPI を乗せ、カバーガラスで封入した。蛍光顕微鏡での観察にはAxioVisionを用いた。また共焦点顕微鏡での観察にはNikon confocal A1 (株式会社ニコン, 東京, 日本) を用いた。

免疫沈降法

細胞に lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 % Triton X-100, 200 μM AEBSF, 10 μM leupeptin, 1μM pepstatin A, 1 mM DTT] を加えて 4°C で 10 分間溶解し、15000 rpm にて 4 °C で 10 分間遠心し上清を回収した。上清に Protein A Sepharose 6MB (GE Healthcare 社, Little Chalfont, United Kingdom) を加えて 1 時間穏やかに攪拌した後、10000 rpm, 2 分間遠心して上清を回収した (pre-wash 操作) 。回収した上清を二等分し、Rabbit -IgG, 抗 CADM1 抗体 (C-18), 抗 caspase-7 抗体を 2 μg ずつ添加し、4°C で一晩穏やかに攪拌した。その後、Protein A

Sepharose 6MB を加えて 4 °C、3 時間穏やかに攪拌した。lysis buffer で 3 回洗浄し、3×SDS sample buffer [0.2 M Tris-HCl (pH 6.8), 30 % glycerol, 6 % SDS, 15 % β-ME, 0.03 % BPB] を加えて 95°C で 5 分間煮沸し、氷上で 3 分間急冷することにより試料を得た。以下、SDS-PAGE はウエスタンブロット解析の項目と同じである。

ペプチド断片の導入

N 末端側を biotin 化した 2 種類のペプチド断片 (CADM1 細胞内領域の caspase-3/7 切断部位で二分される N 末端側と C 末端側の 23 アミノ酸の断片) は MBL (Medical and Biological Laboratories 社, 名古屋, 日本) から購入した。ペプチド断片のアミノ酸配列は C 末端側 (CADM1-CT-C) が RYFARHKGTYFTHEAKGADDAAD 、 N 末端側 (CADM1-CT-N) が ADTAIINAEGGQNNSEEKKEYFI である。導入試薬は Xfect™ Protein Transfection Reagent (Clontech 社, Mountain View, CA, USA) を用い、推奨プロトコルに従った。まず、Deionized H₂O に Xfect Protein Transfection Reagent stock を希釈したチューブを 1、Xfect Protein Buffer に 3.3 μM の各ペプチド断片を溶かしたチューブを 2 とし、各々をよく混合した後、1 と 2 のチューブを混ぜて穏やかにボルテックスする。そして室温で 30 分間インキュベートする。この間にペプチドを導入する細胞を 6×10⁵ cells 分回収し、温めた PBS で 1 回洗浄した後、細胞を 400 μl Opti-MEM (Invitrogen 社) 中でよく再懸濁する。30 分間のインキュベートが終了したら、400 μl Opti-MEM 細胞溶液中に 200 μl ペプチド断片溶液を添加して計 600 μl とし、60 分間 37°C でインキュベートする。イン

キュベート終了後、1.4 ml の完全培地を加えて計 2 ml とし、EGTA を終濃度 5 mM になるように加えて懸濁することにより細胞を剥離させた後、24 時間浮遊・単細胞培養を行った。

β -galactosidase の検出

通常培養では β -galactosidaseを導入し、3時間培養した後にPBSで2回洗浄し、4 % paraformaldehyde (PFA) を乗せて4°Cで20分間放置してからPBSで2回洗浄した。その後、40×X-gal stockをX-gal reaction buffer [35 mM potassium ferrocyanide, 35 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl₂, 0.02% NP-40, 0.01% Na deoxycholate in PBS] に溶解したものを乗せ、遮光して37°Cで3時間反応させた。観察はAxioVisionで行った。浮遊・単細胞培養では β -galactosidaseを導入し、3時間培養した後で1000 rpm、3分間遠心して細胞を回収し、PBSで2回洗浄してからサイトスピンで1000 rpm、3分間遠心して細胞をスライドガラス上にはりつけた。Dako Penで細胞の周りを囲い、4 % PFAで処理する操作からは上述の通常培養に同じである。

統計解析

データは統計解析ソフトSigma Plot 11 (Systat Software社, San Jose, CA, USA)を用いて解析を行った。Studentのt 検定においてP値が0.05未満の場合に有意差ありと判定した。

結果

浮遊・単細胞状態では CADM1 は caspase 認識配列依存的にアポトーシスを誘導する。

最初に CADM1 の caspase 認識配列と細胞死誘導能との関連性を調べるため、エストロゲン感受性で CADM1 を内在性に少量発現する乳がん細胞株である MCF-7 細胞を用いて、vector (MCF-7/v)、野生型 CADM1 (MCF-7/CADM1)、caspase 認識配列の変異体である CADM1-NAAN (MCF-7/NAAN) をそれぞれ恒常的に発現する細胞株を樹立した (図 8A)。CADM1 発現量を GAPDH 発現量で補正した値を下に示す。なお、MCF-7 細胞は caspase-3 を発現しておらず、caspase-7 経路を介してアポトーシスを誘導することが報告されている⁴⁹。これらを各 2 クローンずつ用いて、通常の培養皿 (通常培養)、あるいは軟寒天培地上にて浮遊・単細胞状態 (浮遊・単細胞培養) で培養した (図 8B)。今回 MCF-7 細胞を選択した理由には、①CADM1 を少量発現し、CADM1 を介したシグナルが失われていないことから、高発現させた場合の表現型を生理条件下で評価できると考えられること、②浮遊・単細胞培養を 2 日以上継続すると、ほぼ全ての細胞がトリパンブルーで染色される HeLa 細胞や、その他の細胞と比較して、浮遊・単細胞培養後の死細胞の評価が容易であったこと、③CADM1 の発現欠如が、乳がんの浸潤・転移に相関するという報告があること^{18,19}、などが挙げられる。以下、これらの MCF-7 安定発現細胞株と培養方法を用いて、CADM1 の caspase による切断、およびアポトーシス誘導能について解析を行った。

まず、浮遊・単細胞培養下で caspase 認識配列に依存した細胞死が誘導されるかどうかを検討

するため、通常培養または浮遊・単細胞培養で5日間培養した後、トリパンブルー排除法で死細胞の割合を測定した。その結果、通常培養では全クローンで死細胞が5%以下となり、クローン間での死細胞の割合に差は見られなかった(図9A(a))。対照的に、浮遊・単細胞培養においては全クローンで死細胞が60%以上見られた(図9A(b))。そしてMCF-7/CADM1ではMCF-7/vに比べて死細胞が有意に増加したが、MCF-7/NAANではその増加は見られなかった。さらに、フローサイトメトリーでDNA含量を測定し、SubG1に含まれる細胞の割合を測定した。その結果、通常培養では全クローンでSubG1に含まれる細胞は0.5%以下となり、こちらもクローン間で差は見られなかった(図9B(a))。一方、浮遊・単細胞培養においては全てのクローンでSubG1に含まれる細胞が増加した(図9B(b))。そして、MCF-7/CADM1ではMCF-7/vに比べてSubG1に含まれる細胞が有意に増加したが、MCF-7/NAANではその増加は見られなかった。

次に3日間の浮遊・単細胞培養の後、Annexin Vとpropidium iodide (PI)による染色により、早期および後期アポトーシス細胞の検出を行った(図10A)。ここでは、実験回ごとのAnnexin V陽性細胞とPI陽性細胞の割合に差が生じたが、実験回ごとのAnnexin V陽性細胞とPI陽性細胞の割合をMCF-7/vを基準として相対値に直すとMCF-7/v, MCF-7/CADM1, MCF-7/NAAN間の数値の比率は毎回類似していたため、MCF-7/v(#1, #2)の各陽性細胞の割合の平均値を1として相対値で示した。その結果、MCF-7/CADM1ではMCF-7/vに比べてAnnexin V陽性の早期アポトーシス細胞の割合、PI陽性の後期アポトーシス細胞(ネクローシスを含む)の割合が共に2倍程度に有意に増加したが、その増加はMCF-7/NAANでは見られなかった(図10B, C)。

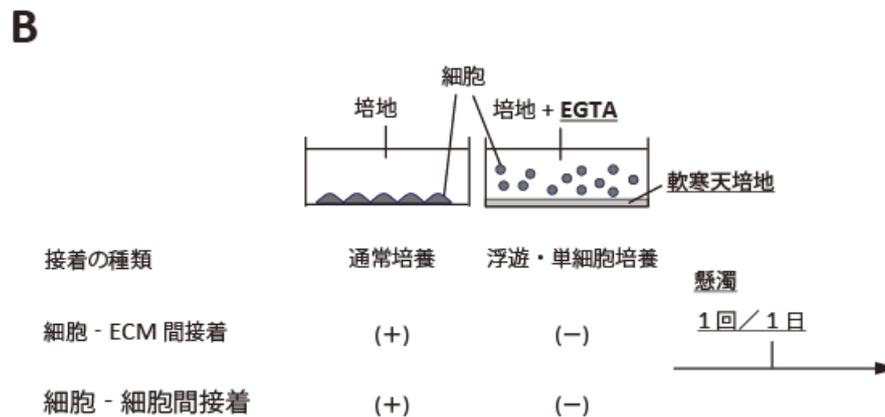
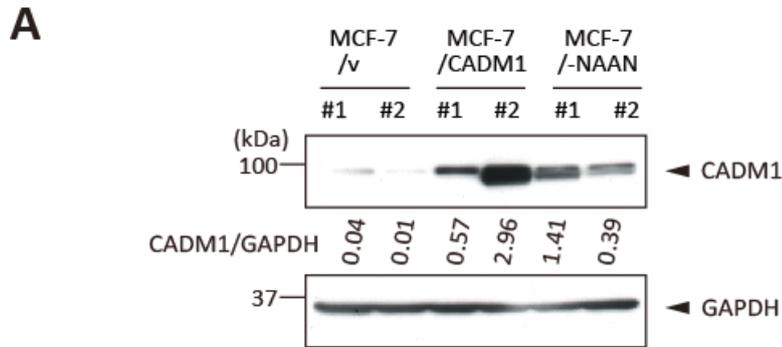


図 8. CADM1 高発現 MCF-7 安定発現細胞株の樹立と培養条件

(A) CADM1 を内在性に少量発現する MCF-7 細胞にコントロールベクター、野生型 CADM1、caspase 認識配列の変異型 CADM1-NAAN を導入し、各安定発現細胞株である MCF-7/v, MCF-7/CADM1, MCF-7/NAAN を 2 クローンずつ樹立した。CADM1 の発現量は抗 CADM1 抗体 (No. 4) を用いてウエスタンブロット解析で検出し、GAPDH 発現量で補正することにより算出した。定量には ImageJ ソフトウェアを使用した。(B) 通常培養皿上での接着培養 (通常培養) と、本研究で CADM1 の細胞死誘導能を解析するために用いた浮遊・単細胞状態を模倣する培養 (浮遊・単細胞培養) の模式図。浮遊・単細胞培養は細胞を培地中でよく懸濁して単細胞状態にした後、軟寒天培地上にまくことによりまず浮遊・単細胞状態とした。さらに細胞間接着を阻害するために 5 mM EGTA を添加し、培養期間中は 1 日 1 回の懸濁を行うことにより浮遊・単細胞状態を維持した。

なお、AnnexinV と PI の両方で染色が見られる細胞は後期アポトーシス細胞と解釈した。以上の結果から、浮遊・単細胞培養で MCF-7 細胞にアポトーシスが誘導されること、および CADM1 は細胞間接着の剥離により caspase 認識配列依存的にアポトーシス誘導を亢進することが示された。

CADM1 細胞外領域断片の添加により、浮遊・単細胞状態で誘導される細胞死が抑制される。

続いて、細胞外領域における CADM1 同士の相互作用が浮遊・単細胞状態で誘導される細胞死に与える影響について検討した。この目的のために、CADM1 細胞外領域と IgG の Fc 領域との融合タンパク質である CADM1-EC-Fc を作製し、MCF-7 安定発現細胞株の浮遊・単細胞培養中に添加して培養を行った。CADM1-EC-Fc の作製には、CADM1-EC-Fc 発現プラスミドを導入して樹立した HEK293 安定発現細胞株を用いた。GIT 培地を満たした HYPERFlask 中で HEK293 安定発現細胞株を大量培養することにより CADM1-EC-Fc を培地中に分泌させ、2 週間程度培養した後上清を回収した。培養上清の精製後、タンパク定量による濃度測定と銀染色による分子量確認 (図 11A) を行った。矢頭で示すサイズのメインバンドが CADM1-EC-Fc であり、これを以下の実験に用いた。なお、浮遊・単細胞培養への添加実験を行うためには大量の精製 CADM1-EC-Fc タンパク質が必要となるがその調整が困難であるため、以下の実験のうち 3 日間の浮遊・単細胞培養後の AnnexinV と PI による染色は MCF-7 / CADM1 のみを、5 日間の浮遊・単細胞培養後のトリパンブルー排除法は MCF-7 / v, MCF-7 / CADM1, MCF-7 / NAAN の各 1 クローン

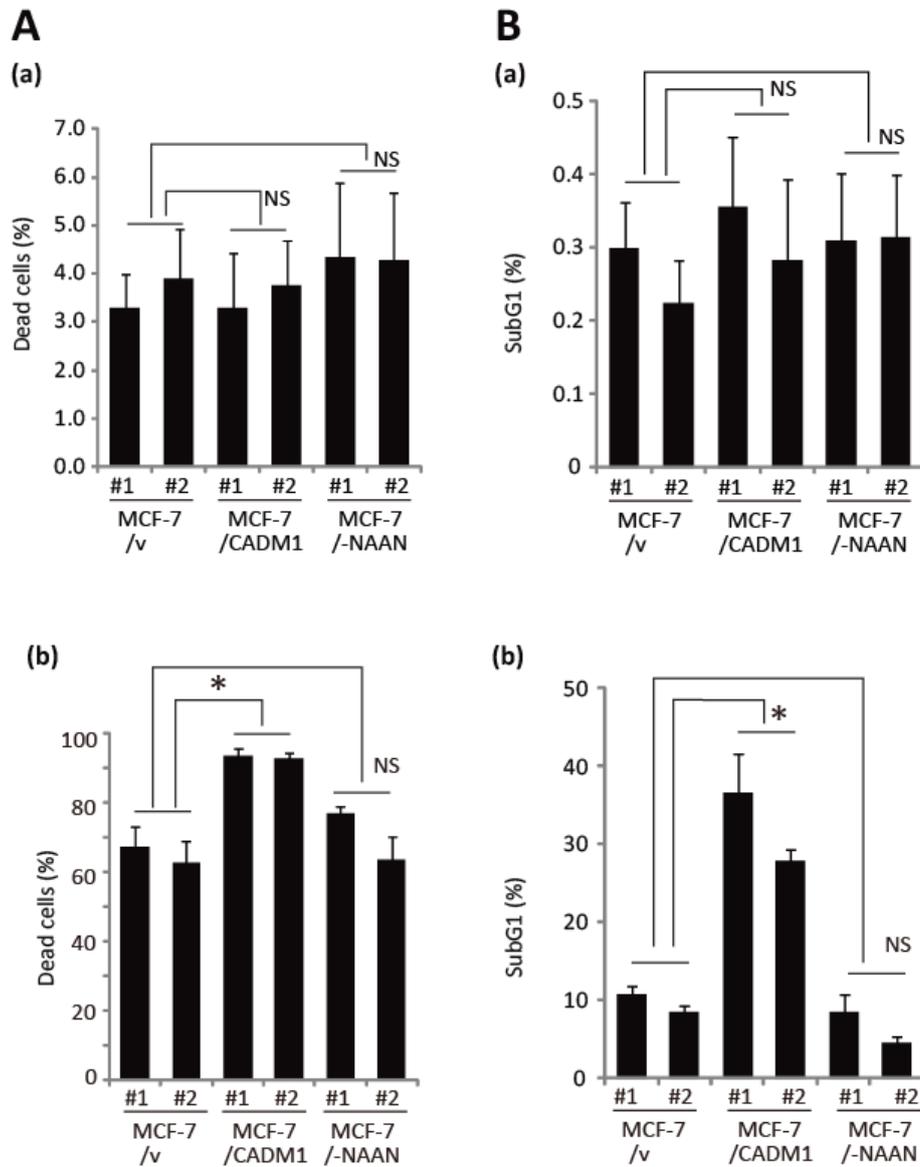


図 9. MCF-7 安定発現細胞株の通常培養、浮遊・単細胞培養後の死細胞の測定

MCF-7/v, MCF-7/CADM1, MCF-7/NAAN を用いて、5 日間の通常培養 (A (a), B (a))、または浮遊・単細胞培養 (A (b), B (b)) を行った。細胞回収後、トリパンブルー排除法による死細胞の測定 (A (a, b)) と、フローサイトメトリーを用いた DNA 含量の測定により SubG1 に含まれるアポトーシス細胞の測定 (B (a, b)) を行った。トリパンブルー排除法では死細胞の割合を横軸とし、3 回以上の独立実験を行い、各回で 200 細胞以上を計数した。フローサイトメトリーによる検出では SubG1 に含まれる細胞の割合を横軸とし、3 回以上の独立実験を行い、各回で 20000 細胞以上を計数した。(mean ± SD, *, p < 0.01, NS, no significant)

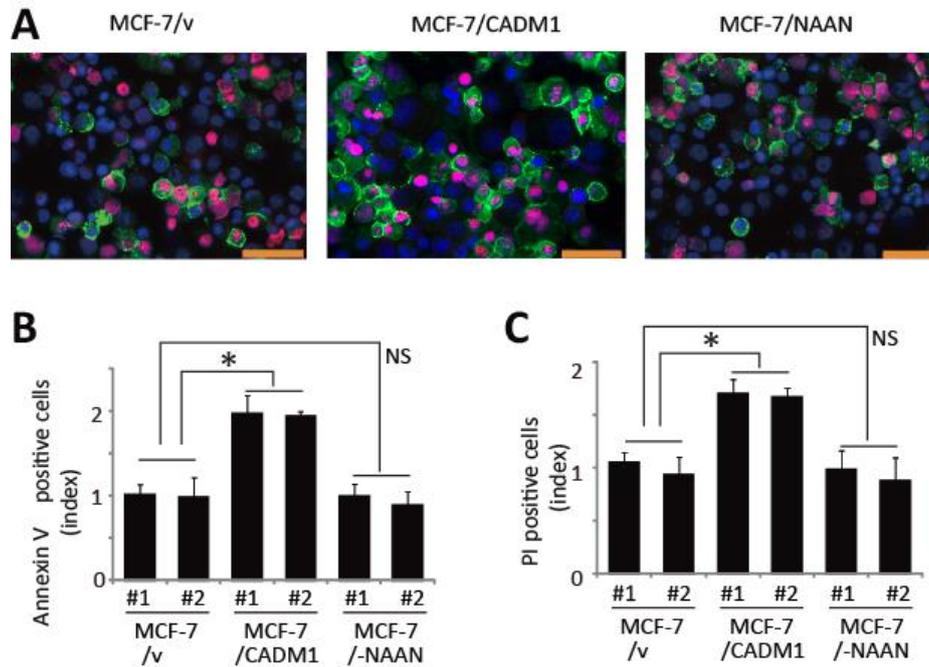


図 10. MCF-7 安定発現細胞株の浮遊・単細胞培養後の早期・後期アポトーシス細胞の測定

(A) MCF-7/v, MCF-7/CADM1, MCF-7/NAAN を用いて、3 日間の浮遊・単細胞培養を行った後、Annexin V 陽性の早期アポトーシス細胞 (緑)、PI 陽性の後期アポトーシス細胞 (赤)、DAPI (青) を検出した。Bars, 50 μ m. (B, C) Annexin V 陽性細胞、PI 陽性細胞の割合は、MCF-7/v (#1, #2) の各陽性細胞の割合の平均値を 1 とし、相対値で示した。3 回以上の独立実験を行い、各回で 200 細胞以上を計数した。(mean \pm SD, *, $p < 0.01$, NS, no significant)

のみを用いて実験を行った。

まず、CADM1-EC-Fc を添加して 24 時間の浮遊・単細胞培養を行った後、細胞表面の CADM1 と CADM1-EC-Fc との相互作用を IgG の Fc 領域に対する抗体を用いて免疫染色法で検出した。その結果、MCF-7/CADM1 #2、MCF-7/NAAN #1 では、コントロールの IgG 添加群と比較して CADM1-EC-Fc 添加群でのみその相互作用を確認することができたが、MCF-7/v #1 では相互作用を確認することはできなかった (図 11B)。次に 3 日間の浮遊・単細胞培養の後、Annexin V と PI による染色により、早期および後期アポトーシス細胞の検出を行った (図 11C)。その結果、IgG 添加群と比較して、CADM1-EC-Fc の添加により AnnexinV 陽性細胞、PI 陽性細胞共に用量依存的に有意に減少した (図 11D, E)。さらに 5 日間の浮遊・単細胞培養後、トリパンブルー排除法により死細胞を検出したところ、MCF-7/CADM1 #2 では CADM1-EC-Fc 添加により IgG 添加群と比較して生細胞が有意に増加した (図 11F)。一方、MCF-7/v #1 および MCF-7/NAAN #1 では CADM1-EC-Fc 添加による生細胞の増加は見られなかった (図 11G)。またこの時、MCF-7/CADM1 #2 の IgG 添加群では 7%程度しか生細胞が見られなかったのに対し、CADM1-EC-Fc を 0.25 μ M 添加すると生細胞が 20%程度まで増加した。MCF-7/v #1 および MCF-7/NAAN #1 では生細胞が 20-30%以上見られるが、MCF-7/CADM1 #2 でも CADM1-EC-Fc の添加によりこの値に近いところまで細胞死誘導を抑えることが可能であることが示唆された。以上の結果から、CADM1-EC-Fc 添加により、浮遊・単細胞培養で誘導される細胞死が抑制されることが示された。

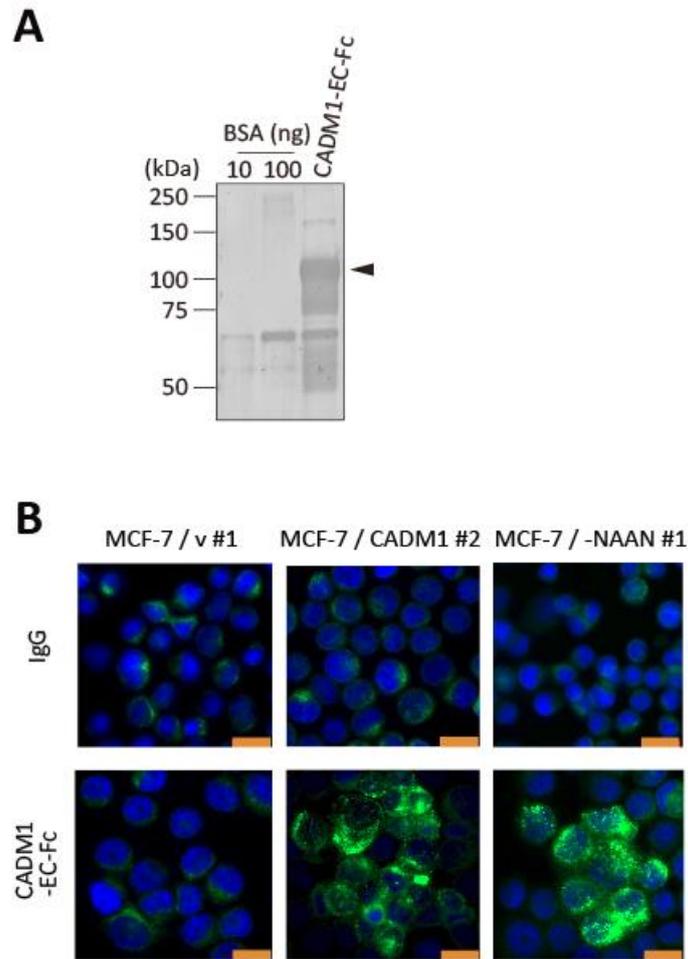
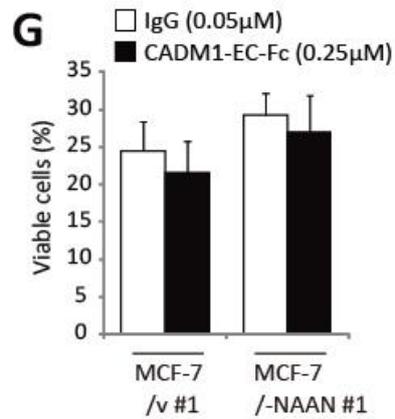
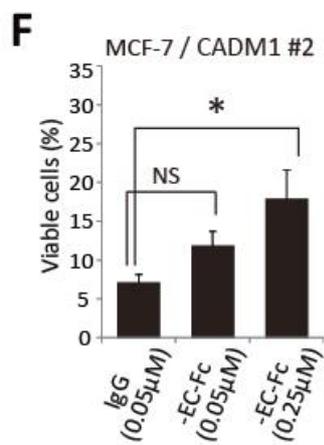
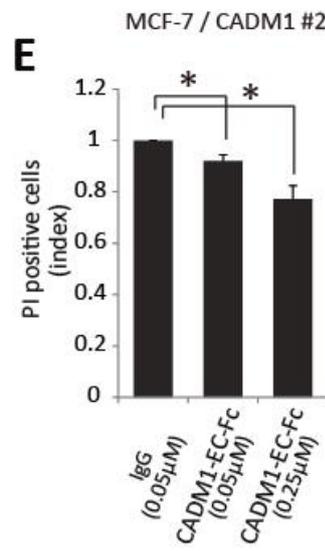
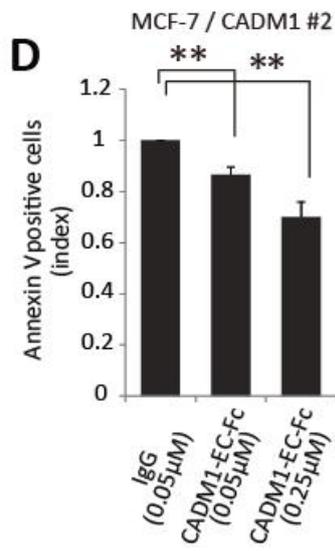
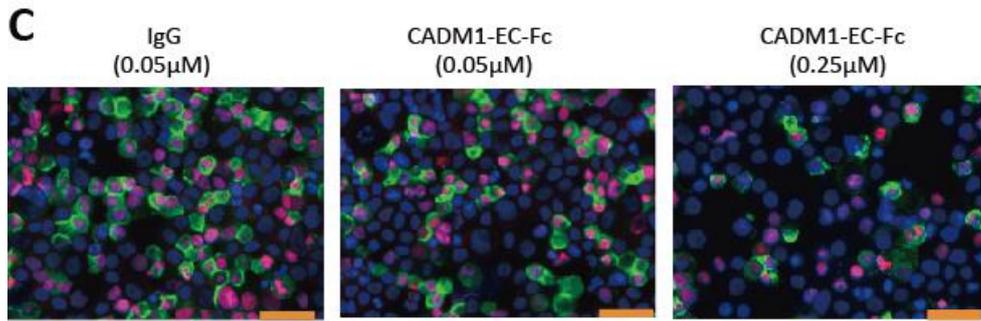


図 11. 浮遊・単細胞培養下の MCF-7 安定発現細胞株への CADM1 細胞外領域断片 (CADM1-EC-Fc) 添加による、相互作用の検出と死細胞の測定

(A) CADM1-EC-Fc 発現 HEK293 安定細胞株を GIT 培地中で大量培養し、上清中に分泌された CADM1-EC-Fc を回収・精製し、ポリアクリルアミド泳動後、銀染色法で CADM1-EC-Fc の分子量を確認した。(B-G) MCF-7/v #1, MCF-7/CADM1 #2, MCF-7/NAAN #1 の浮遊・単細胞培養中に CADM1-EC-Fc (0.05 μ M, 0.25 μ M) を添加して培養した。コントロールとして IgG (0.05 μ M) を添加した。(B) MCF-7/v #1, MCF-7/CADM1 #2, MCF-7/NAAN #1 の浮遊・単細胞培養を開始してから 24 時間後に細胞を回収し、抗 IgG-Fc 領域抗体 (緑)、DAPI (青) で検出した。Bars, 20 μ m. (C) MCF-7/CADM1 #2 の浮遊・単細胞培養を開始してから 3 日後に細胞を回収し、Annexin V (緑)、PI (赤)、DAPI (青) で染色した。Bars, 50 μ m. (D, E) Annexin V 陽性細胞、PI 陽性細胞の割合は、IgG 添加群の各陽性細胞の割合の平均値を 1 とし、相対値で示した。(F, G) MCF-7/v #1, MCF-7/CADM1 #2, MCF-7/NAAN #1 の浮遊・単細胞培養を開始してから 5 日後に細胞を回収し、トリパンブルー排除法による死細胞の測定を行った。全てにおいて 3 回以上の独立実験を行い、各回で 300 細胞以上を計数した。(mean \pm SEM, **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, NS, no significant)



接着剥離によるアポトーシス誘導は、CADM1 細胞内領域の caspase 認識配列を介した caspase-7 による切断に依存する。

前述の通り、MCF-7 細胞は caspase-3 を発現しておらず、caspase-7 経路を介してアポトーシスを誘導する。そこで次に、MCF-7 細胞では CADM1 が caspase-7 によって切断されることによりアポトーシスが誘導されるかどうかを検討した。まず MCF-7 / CADM1 #2 を 3 日間通常培養および浮遊・単細胞培養し、プロテアソーム阻害剤 MG132 で 2 時間処理した後に細胞を回収し、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、CADM1 細胞内断片 (CADM1-CT) は通常培養でも検出されたが、浮遊・単細胞培養でより多くの断片量が検出された (図 12A)。また、MG132 処理により断片量が増加した。この時、CADM1 全長の発現量は浮遊・単細胞培養において通常培養よりも減少した。加えて、浮遊・単細胞培養では CADM1 全長よりもサイズの小さいバンドが何本か見られたが、これらは浮遊・単細胞培養下で caspase-7 や他のプロテアーゼにより分解を受けた断片、あるいは CADM1 細胞外領域の糖鎖修飾が不十分な CADM1 由来のバンドであると考えられる。また caspase-7 の発現量は浮遊・単細胞培養において通常培養より減少した一方、cleaved caspase-7 の発現は浮遊・単細胞培養下でのみ検出されたことから、caspase-7 は浮遊・単細胞培養下でのみ活性化されることが示された。

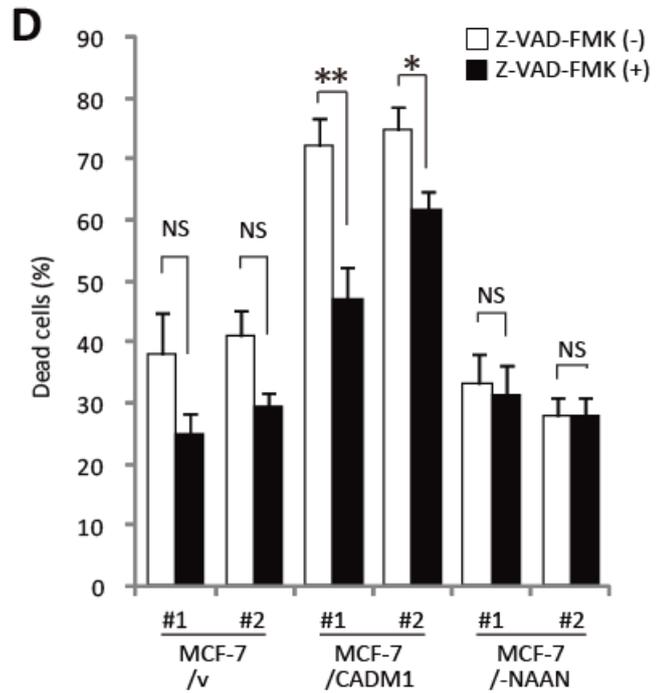
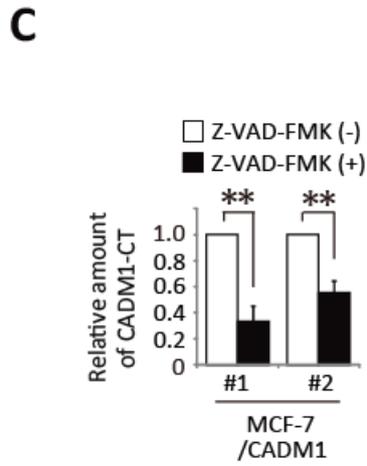
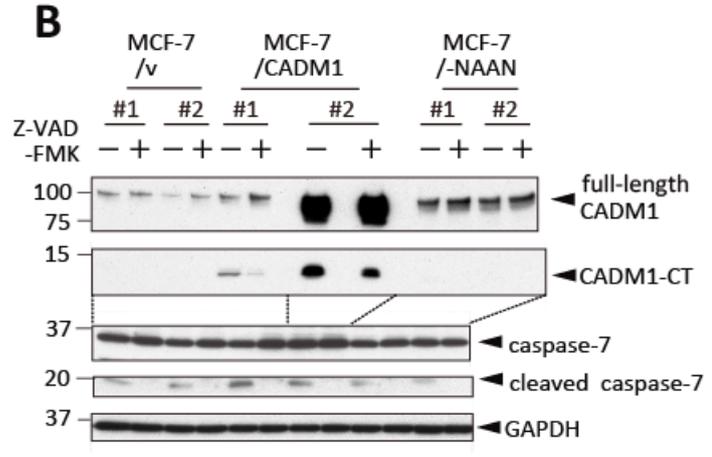
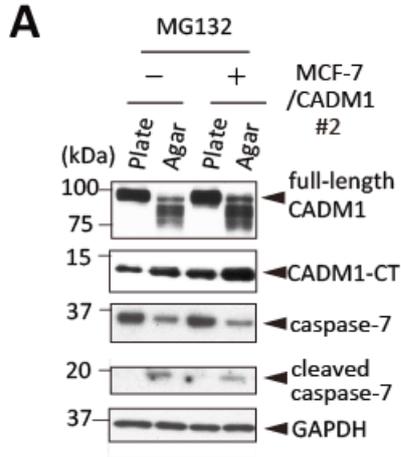
次に、CADM1 の切断とアポトーシス誘導能が caspase-7 の活性に依存するかどうかを検討するために、pan-caspase 阻害剤 Z-VAD-FMK (caspase-1, -3, -4, -7 を阻害) の存在下・非存在下で MCF-7 安定発現細胞株を 3 日間浮遊・単細胞培養した。細胞回収後にウエスタンブロット解析

を行ったところ、CADM1-CT は長時間露光では MCF-7 / v, MCF-7 / NAAN でも検出されたが、MCF-7/NAAN に比べて MCF-7/CADM1 でより多く検出された (図 12B)。また MCF-7/CADM1 の CADM-CT 発現量は、#1、#2 共に Z-VAD-FMK の添加により有意に減少したことから、CADM-CT は caspase による切断によって生じることが示された (図 12C)。一方、cleaved caspase-7 の発現は全てのクローンにおいて Z-VAD-FMK 添加により減少していた。同時にトリパンブルー排除法により死細胞の割合を測定したところ、CADM1-CT 量が多く見られた MCF-7/CADM1 では死細胞が多く見られた (図 12D)。また MCF-7 / v, MCF-7 / NAAN では Z-VAD-FMK 添加による死細胞の変化は見られなかったが、MCF-7 / CADM1 では Z-VAD-FMK の添加により死細胞が有意に減少した。同様に、Z-VAD-FMK の存在下・非存在下で MCF-7 安定発現細胞株を 3 日間浮遊・単細胞培養し、フローサイトメトリーで DNA 含量を測定することにより、SubG1 に含まれる細胞の割合を測定した。その結果、こちらも CADM1-CT 量が多く見られた MCF-7/CADM1 では死細胞が多く見られた (図 12E)。一方、MCF-7 / v, MCF-7 / CADM1 では Z-VAD-FMK 添加により SubG1 に含まれる細胞の割合が有意に減少したが、MCF-7 / NAAN ではこの減少は見られなかった。先述の通り、Z-VAD-FMK は caspase-1, -3, -4, -7 を阻害するが、このうち caspase-1, 4 は炎症関連 caspase として知られ、また認識配列もアポトーシス実行型 caspase である caspase-3, 7 とは異なる。さらに MCF-7 が caspase-3 の発現を欠如することから、実質的に CADM1 細胞内領域の caspase-3/7 認識配列を切断する caspase は caspase-7 のみであると考えられる。以上から、浮遊・単細胞状態の MCF-7/CADM1 で誘導されるアポトーシスは、caspase-7 による CADM1

の切断によって誘導されることが示された。

続いて、CADM1-CT は CADM1 が caspase-7 によって切断されることにより生じるものであるかを検討するために、MCF-7 / CADM1 #1 に 2 種類の siRNA を用いて caspase-7 遺伝子の発現を抑制し、3 日間浮遊・単細胞培養を行った。その結果、CADM1-CT の発現量は siControl と比較して siCaspase-7 (1)/(2) でそれぞれ 53%, 73% まで抑制された (図 12F)。このことから、CADM1-CT は caspase-7 による切断産物であることが示された。

さらに、代表的な Dependence Receptor である DCC が細胞内領域で caspase-3 や caspase-9 と複合体を形成するように、CADM1 も caspase-7 と相互作用するかどうかを検討するために、抗 CADM1 抗体と抗 caspase-7 抗体を用いた免疫沈降法を行った。まず、MCF-7 / CADM1 #2 の lysate を回収した後、抗 CADM1 抗体を用いて免疫沈降法を行ったところ、CADM1 全長、CADM1-CT と共に caspase-7 が共沈した (図 12G (a))。このとき、cleaved caspase-7 は共沈しなかった。次に、抗 caspase-7 抗体を用いて同様に MCF-7 / CADM1 #2 lysate の免疫沈降を行ったところ、caspase-7 と共に CADM1 全長が共沈した (図 12G (b))。このときに CADM1-CT は共沈しなかったことから、CADM1-CT 以外の領域で CADM1 と caspase-7 が相互作用していることが示唆されるが、CADM1-CT の分子量が小さいことから、今回の免疫沈降ではバンドとして検出可能な十分量の CADM1-CT が共沈しなかった可能性もある。いずれにせよ、CADM1 と caspase-7 との間には何らかの相互作用が存在することが示された。また以上の結果から、浮遊・単細胞状態における CADM1 の切断とアポトーシス誘導は caspase-7 の活性に依存することが示された。



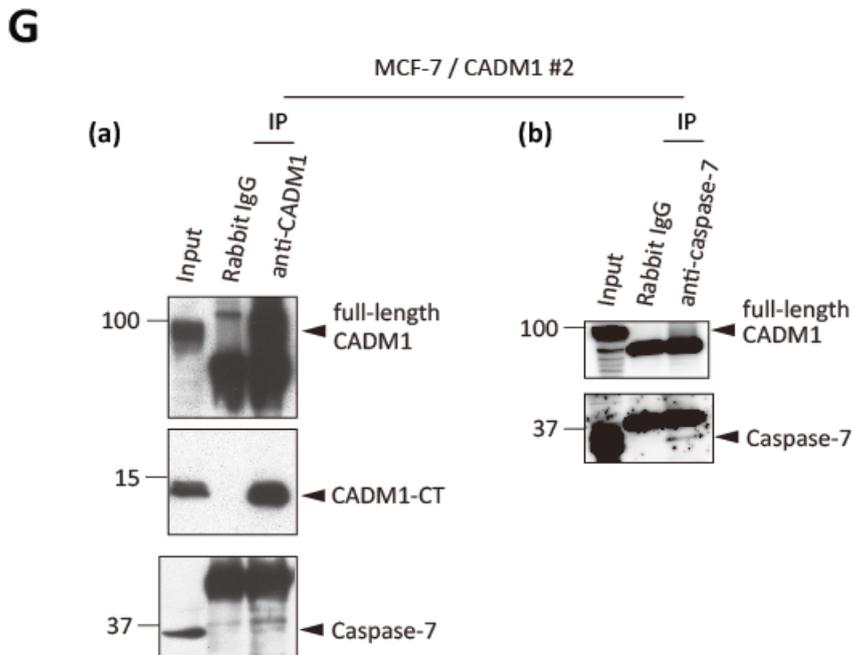
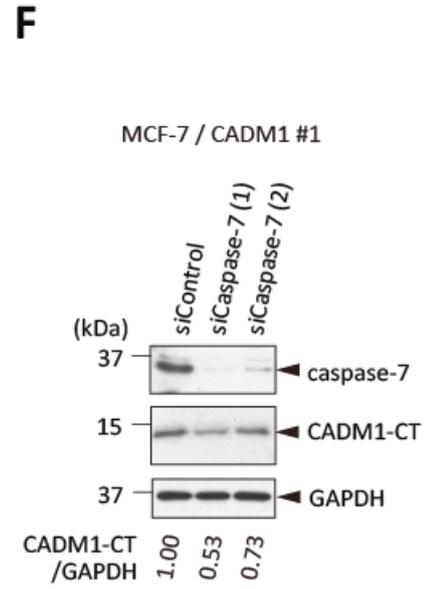
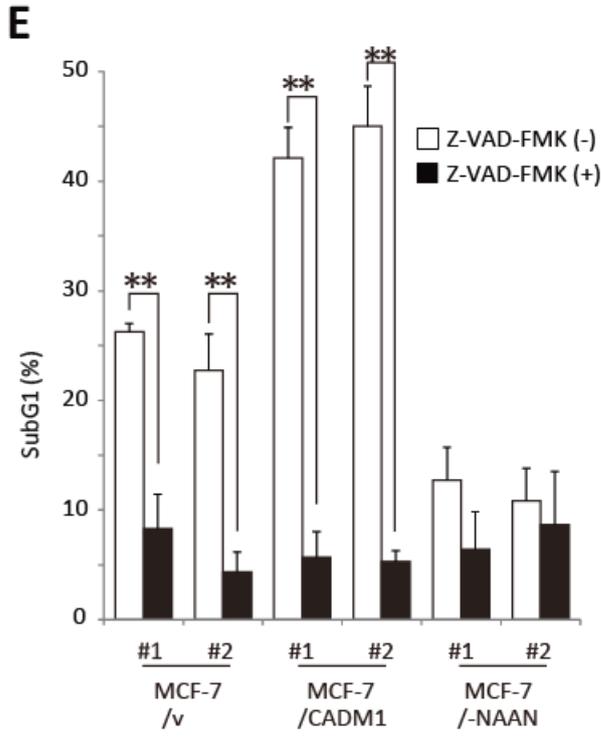


図 12. MCF-7 安定発現細胞株の浮遊・単細胞培養後の CADM1 切断断片と caspase-7 の検出、および死細胞の測定

(A) MCF-7/CADM1 #2 を 3 日間通常培養または浮遊・単細胞培養した後、10 μ M MG132 (プロテアソーム阻害剤) を培地中に添加し 2 時間処理してから細胞回収し、抗 CADM1 抗体 (No.4)、抗 caspase-7 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。(B) MCF-7/v, MCF-7/CADM1, MCF-7/NAAN を Z-VAD-FMK (pan-caspase 阻害剤) の存在下・非存在下で 3 日間浮遊・単細胞培養した後、10 μ M MG132 を培地中に添加し 2 時間処理してから細胞回収し、抗 CADM1 抗体 (No.4)、抗 caspase-7 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。(C) (B) の MCF-7/CADM1 (#1, #2) CADM1-CT 量を ImageJ で定量し、GAPDH で補正することにより定量した。#1 および #2 の Z-VAD-FMK (-) の定量・補正値を 1 としして相対値で示した。5 回の独立実験を行った。(mean \pm SEM, **, $p < 0.01$). (D) MCF-7/v, MCF-7/CADM1, MCF-7/NAAN を Z-VAD-FMK の存在下・非存在下で 3 日間浮遊・単細胞培養した後、トリパンブルー排除法で死細胞を測定した。4 回以上の独立実験を行い、各回で 200 細胞以上を計数した。(mean \pm SEM, **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, NS, no significant). (E) MCF-7/v, MCF-7/CADM1, MCF-7/NAAN を Z-VAD-FMK の存在下・非存在下で 3 日間浮遊・単細胞培養した後、フローサイトメトリーを用いた DNA 含量の測定により SubG1 に含まれるアポトーシス細胞を測定した。3 回以上の独立実験を行い、各回で 20000 細胞以上を計数した。(mean \pm SEM, **, $p < 0.01$). (F) MCF-7/CADM1 #1 に siRNA をトランスフェクションして caspase-7 遺伝子の発現を抑制し、3 日間浮遊・単細胞培養を行った後、10 μ M MG132 を培地中に添加し 2 時間処理してから細胞回収し、抗 CADM1 抗体 (No.4)、抗 caspase-7 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。(G) MCF-7/CADM1 #2 を 3 日間浮遊・単細胞培養して細胞回収した後、抗 CADM1 抗体 (C-18) を用いた免疫沈降 (a)、および抗 caspase-7 抗体を用いた免疫沈降 (b) を行った。免疫沈降後の lysates を回収し、抗 CADM1 抗体 (No.4)、抗 caspase-7 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

接着剥離による細胞死誘導には、CADM1 細胞内領域のうち caspase 切断部位より C 末端側が重要である。

最後に、代表的な Dependence Receptor である DCC では切断後の細胞内領域 N 末端側が細胞死誘導に重要であり、UNC5H2 では切断後の細胞内領域 C 末端側が細胞死誘導に重要であったように、CADM1 の細胞内領域のうち、caspase-7 で切断された N 末端側、C 末端側のどちらが細胞死誘導に重要であるかを検討した。この目的のために、CADM1 細胞内領域のうち caspase 切断部位で二分される C 末端側 23 アミノ酸 (CADM1-CT-C) および N 末端側 23 アミノ酸 (CADM1-CT-N) をそれぞれ *in vitro* で合成した (図 5A)。なお、各々のペプチド断片の N 末端は biotin 化されている。コントロールペプチドとして caspase 認識配列を含んでいない MPP1 の 437-454 アミノ酸 (18 アミノ酸) 断片として用いた。そして、これらのペプチド断片を親株 MCF-7 細胞内に直接導入することにより細胞死が誘導されるかどうかを検討した。ペプチド断片を細胞内に直接導入した理由は、23 アミノ酸という非常に短いペプチドを遺伝子導入した場合、その発現を確認することが極めて困難だからである。また断片にタグを付ける実験は、タグの方がペプチド断片よりサイズが大きくなること、ペプチド断片ではなくタグ本体が実験結果に影響を与える恐れが強いことなどから行わなかった。

今回使用したタンパク導入試薬 Xfect™ Protein Transfection Reagent には、細胞内への導入を確認するための陽性コントロールとして β -galactosidase が付属されている。そこで、まずタンパク導入のコントロール実験として、通常培養下で β -galactosidase を導入し、X-gal を基質として染

色した。その結果、通常培養では 80%程度の細胞が青色に染まったことから、 β -galactosidase control が導入されたことが確認された (図 13A (a, b))。次に通常培養下で CADM1-CT-C, -CT-N ペプチド断片を導入し、15 時間後に細胞を回収して死細胞を測定したところ、死細胞の割合に差は見られなかった。そこで、ペプチド断片を浮遊・単細胞状態で親株 MCF-7 細胞内に直接導入することにした。まず、浮遊・単細胞状態で β -galactosidase control を導入し、X-gal を基質として染色したところ、通常培養下より導入効率は落ちるものの、60%程度の細胞が青く染まった (図 13A (c, d))。

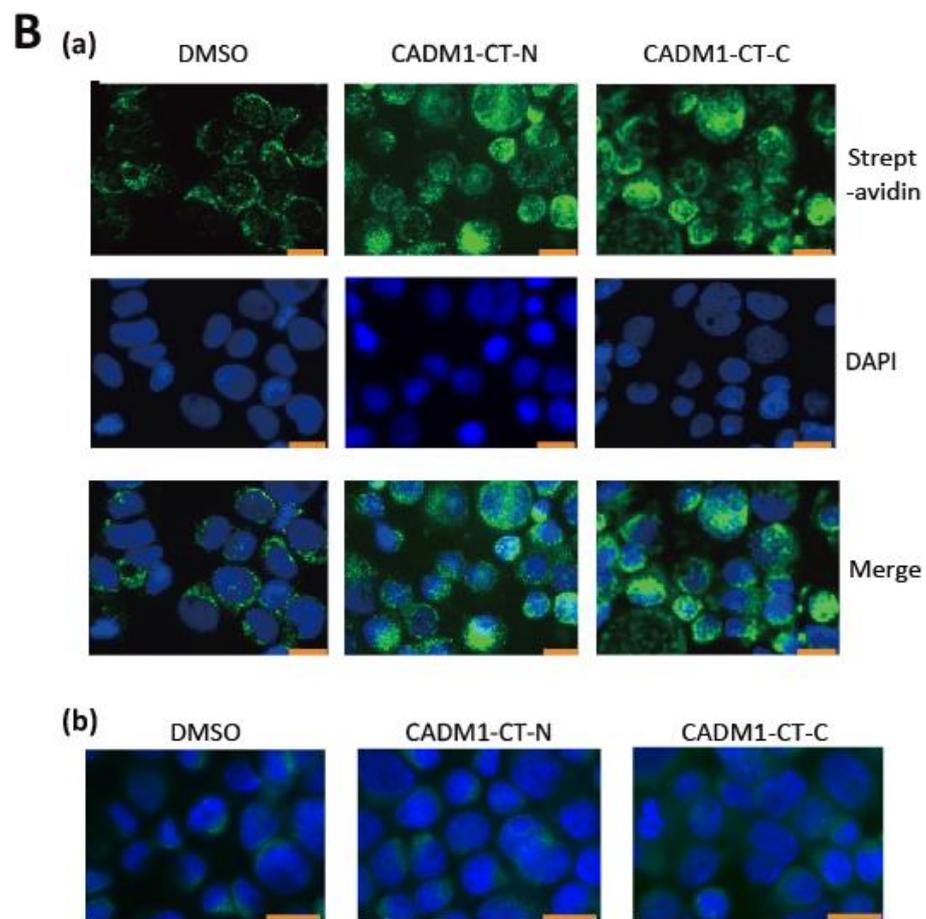
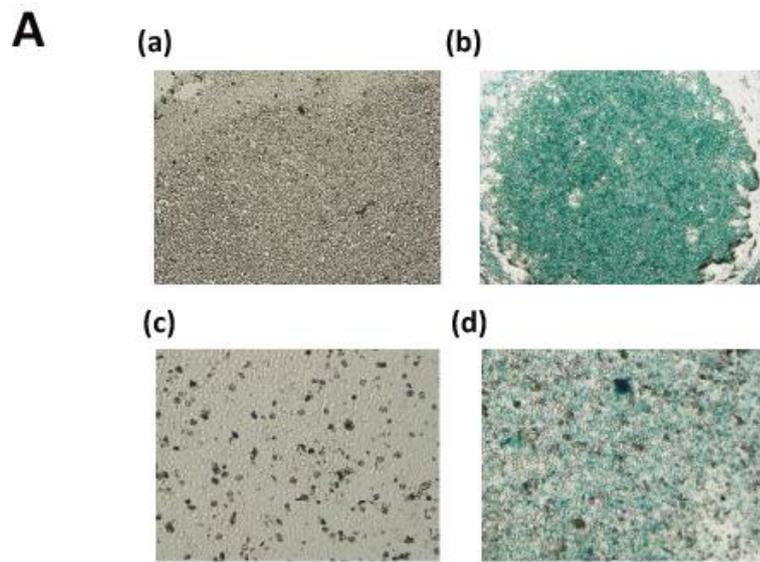
次に、これらのペプチド断片を浮遊・単細胞状態で親株 MCF-7 細胞内に直接導入した後、浮遊・単細胞培養を行った。前述の通り CADM1-CT-C, -CT-N の両ペプチド断片の N 末端は biotin 化されているため、ペプチド断片を導入してから 3 時間浮遊・単細胞培養した後に MCF-7 細胞を回収し、蛍光標識した streptavidin との結合を免疫染色で検出し、蛍光顕微鏡で観察を行った。その結果、コントロールとして DMSO を導入した細胞では細胞内が強く染色されることはなかったが、CADM1-CT-C, -CT-N 両ペプチド断片を導入した MCF-7 細胞では、蛍光標識した streptavidin により細胞内が強く染まる細胞が観察され、ペプチド断片が細胞内に導入されたことが示唆された (図 13B (a))。しかしながら、 β -galactosidase、CADM1-CT-C, -CT-N 両ペプチド断片は必ずしも細胞内に導入されたわけではなく、細胞表面に付着している可能性も考えられる。そこで、ペプチド断片を導入し、3 時間浮遊・単細胞培養を行った MCF-7 細胞を回収した後、膜透過処理をせず免疫染色を行った。その結果、DMSO を導入した細胞と比較して、CADM1-

CT-C, -CT-N 両ペプチド断片を導入した細胞で蛍光標識した streptavidin で細胞内が強く染まる像は観察されなかった(図 13B (b))。さらに同様に、ペプチド断片を導入し、3 時間浮遊・単細胞培養を行った MCF-7 細胞を回収した後、蛍光標識した streptavidin との結合を免疫染色で検出し、共焦点顕微鏡で観察を行った。この際の条件は、弱い蛍光シグナルは検出できない感度で観察を行った。その結果、DMSO を導入した細胞と比較して、CADM1-CT-C, -CT-N 両ペプチド断片を導入した細胞では、赤矢頭で示すように核内にペプチド断片が局在している細胞が観察された(図 13C)。以上の結果から、浮遊・単細胞培養下において細胞内にペプチドが導入されたことが示された。

そこで、ペプチド断片を導入してから 24 時間浮遊・単細胞培養を行った後、トリパンブルー排除法で死細胞の割合を測定した。その結果、CADM1-CT-C ペプチド断片の導入によりコントロールの DMSO、および MPP1 ペプチドと比較して死細胞が有意に増加したが、その増加は CADM1-CT-N ペプチド断片の導入では見られなかった(図 13D)。この時、コントロールの DMSO および MPP1 を導入した MCF-7 細胞でも 30-40%程度の死細胞が検出されているが、これはペプチド導入試薬自体の細胞への毒性と、浮遊・単細胞培養を経たことにより誘導された細胞死の影響であると考えられる。

さらに CADM1-CT-C の重要性を検討するために、CADM1-CT-C の 23 アミノ酸を欠損する CADM1 (CADM1 Δ CT-C, 図 5A) を MCF-7 に導入し、安定発現細胞株を 2 クローン得た (MCF-7 / Δ CT-C #1, #2)。2 クローンの CADM1 発現量を他の細胞株と比較するために行ったウエスタ

ンブロット解析の結果を図 13E に示す。これらクローンを用いて 3 日間浮遊・単細胞培養を行った後、トリパンブルー排除法で死細胞の割合を測定したところ、MCF-7/ Δ CT-C は MCF-7/v と比較して死細胞の割合に差は見られなかった (図 13F) 。以上の結果から、接着剥離による細胞死は、CADM1 細胞内領域のうち caspase 切断部位より C 末端側の断片により誘導されることが示された。



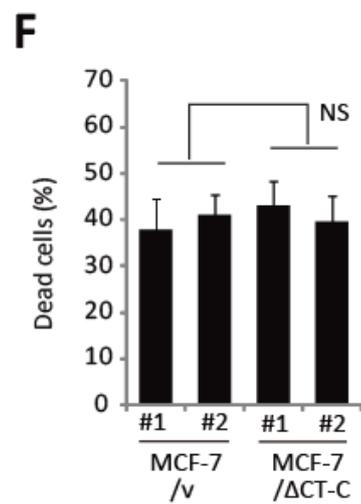
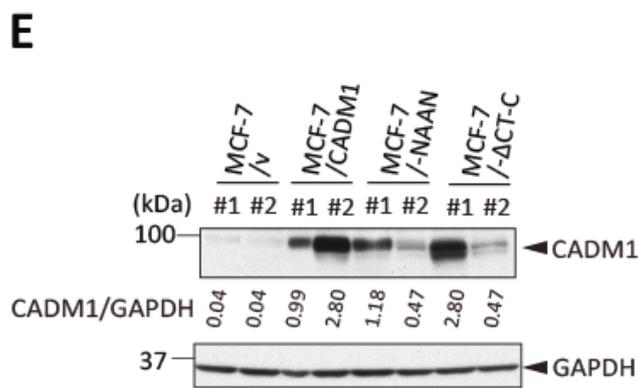
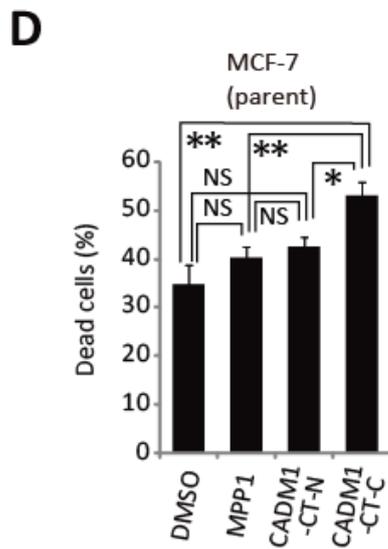
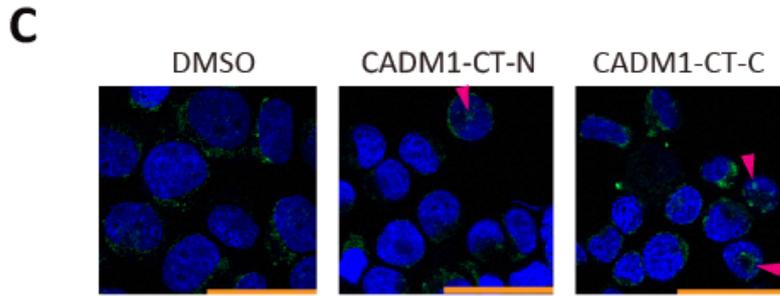


図 13. 親株 MCF-7 細胞への CADM1-CT ペプチド断片の導入

(A) 通常培養下の親株 MCF-7 細胞に Xfect™ Protein Transfection Reagent を用いて、DMSO (コントロール)(a) あるいは β -galactosidase (b) を導入した後、X-gal を基質として染色を行った。同様に浮遊・単細胞培養下の親株 MCF-7 細胞に DMSO (c) あるいは β -galactosidase (d) を導入した後、X-gal を基質として染色を行った。(B)(a) CADM1 細胞内領域の C 末端側 23 アミノ酸、N 末端側 23 アミノ酸にあたる CADM1-CT-C ペプチド断片および CADM1-CT-N ペプチド断片を合成し、浮遊・単細胞培養上で親株 MCF-7 細胞内に導入した。導入ペプチド断片の N 末端側は biotin 化されている。ペプチド断片導入から 3 時間後、Alexa Fluor 488 標識された streptavidin (緑) と DAPI (青) で免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。Bars, 20 μ m. (b) ペプチド断片導入から 3 時間後、膜透過処理をせず Alexa Fluor 488 標識された streptavidin (緑) と DAPI (青) で免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。Bars, 20 μ m. (C) ペプチド断片導入から 3 時間後、Alexa Fluor 488 標識された streptavidin (緑) と DAPI (青) で免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察を行った。核内に局在すると考えられるペプチド断片を赤矢頭で示した。Bars, 20 μ m. (D) 浮遊・単細胞状態で親株 MCF-7 細胞内に DMSO (コントロール)、MPP1 ペプチド断片(コントロールペプチド)、CADM1-CT-C ペプチド断片、CADM1-CT-N ペプチド断片を導入し、24 時間浮遊・単細胞培養を行った。その後、トリパンブルー排除法で死細胞を測定した。5 回以上の独立実験を行い、各回で 200 細胞以上を計数した。(mean \pm SEM, **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$, NS, no significant). (E) MCF-7 細胞に CADM1 の C 末端側 23 アミノ酸欠損型の CADM1- Δ CT-C を導入し、安定発現細胞株である MCF-7/ Δ CT-C を独立に 2 クローン樹立した。MCF-7/ Δ CT-C の CADM1 発現量は他の安定発現細胞株と共に抗 CADM1 抗体 (No. 4) を用いてウエスタンブロット解析で検出し、GAPDH 発現量で補正することにより算出した。定量には ImageJ ソフトウェアを使用した。(F) MCF-7/v、および MCF-7/ Δ CT-C を 3 日間浮遊・単細胞培養した後、トリパンブルー排除法で死細胞を測定した。4 回以上の独立実験を行い、各回で 200 細胞以上を計数した。(mean \pm SEM, NS, no significant)

考察

正常上皮では、CADM1 は細胞膜上でシス・ホモフィリック二量体を形成し、隣接細胞の CADM1 二量体とトランス・ホモフィリックに相互作用することにより、細胞接着を介した上皮構造の形成と維持に関与する。これに対し本研究では細胞 - ECM 間接着の存在下、もしくは浮遊・凝集状態において、CADM1 を介した細胞 - 細胞間接着が存在すると CADM1 は生存に働くが、浮遊・単細胞状態となり CADM1 同士の相互作用が失われると CADM1 は細胞死を誘導することを示した (図 14A)。この知見から、CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用がリガンドかつ受容体として機能すると仮定すると、CADM1 は全く新しいタイプの Dependence Receptor として働く可能性をさらに検討した。最初に、CADM1 を高発現する MCF-7 / CADM1 ではアポトーシスが誘導されることをトリパンブルー排除法、SubG1 分画、AnnexinV および PI 陽性細胞を検出することにより示した。次に、これまでの代表的な Dependence Receptors のリガンド - 受容体の関係性のように、CADM1 細胞外領域と IgG の Fc 領域との融合タンパク質である CADM1-EC-Fc を MCF-7/CADM1 の浮遊・単細胞培養中に添加することにより、細胞死が抑制されることを示した。これは CADM1-EC-Fc が細胞外領域における CADM1 同士のトランス・ホモフィリック相互作用を模倣することにより、細胞 - 細胞間の接着剥離により誘導される細胞死が抑制されたものと考察される。CADM1 細胞内領域に caspase-3/7 認識配列が存在することも、CADM1 が Dependence Receptor として働く可能性を示唆する要素である。先行研究により *in vitro* でリコンビナント CADM1 が精製 caspase-3 により切断されること、および本研究により浮

遊・単細胞培養下において MCF-7 / CADM1 では CADM1-CT の増加と CADM1 全長の減少が見られることも示された。さらに、MCF-7/CADM1 の浮遊・単細胞培養下における CADM1-CT の増加は pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK の添加、および caspase-7 に対する siRNA により抑制された。最後に、CADM1-CT-C ペプチド断片の親株 MCF-7 細胞への導入により、CADM1-CT-N ペプチド断片およびコントロール MPP1 ペプチドと比較して細胞死が有意に増加したことは、caspase-7 によって切断を受けた CADM1 細胞内領域のうち C 末端側が細胞死誘導に重要であることを示すものである。以上、得られた知見を総合し、浮遊・単細胞状態における CADM1 による細胞死誘導について、図 14B のようなモデルを提示したい。接着細胞において、細胞 - 細胞間での CADM1 を介した相互作用が存在すると、CADM1 は細胞内領域で 4.1B や MAGuK 群と複合体を形成し、細胞間接着、上皮構造の維持、および生存へと働く (図 14B (a))。一方、CADM1-CT は通常培養でも生じることから、細胞 - ECM 間の接着が失われ、かつ CADM1 を介した細胞 - 細胞間接着が両方とも失われると、細胞内の三者複合体が崩壊し、CADM1 シス - ホモフィリック二量体が単量体となり、CADM1 の細胞内領域が caspase-7 による切断を受けることが予測される。この際に生成された CADM1 の C 末端断片により caspase-7 が活性化され、アポトーシスを誘導することが示唆される。このように、細胞 - 細胞間の CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用がリガンドかつ受容体として機能するという仮説を採択するならば、以上の CADM1 の特徴はこれまでに報告のある Dependence Receptors の定義に合致するものである。

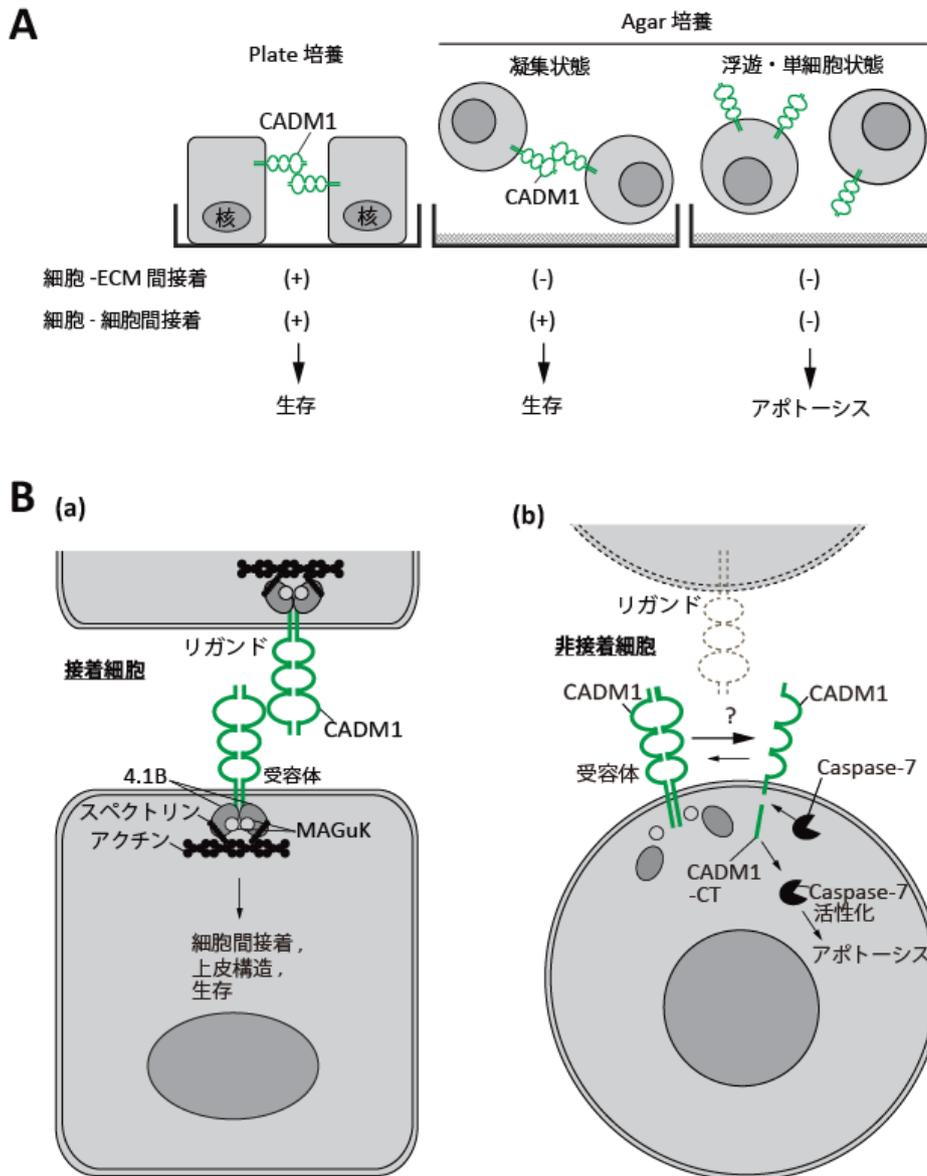


図 14. CADM1 が新しいタイプの Dependence Receptor として働く機構を示す模式図

(A) 細胞間接着の存在下、および細胞の凝集状態において、CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用が存在すると、CADM1 は生存に働く。一方、浮遊・単細胞状態となり CADM1 同士の相互作用が失われると、CADM1 は細胞死を誘導する。(B) 接着細胞において、CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用が存在すると、CADM1 は細胞内領域で 4.1B や MAGuK 群と複合体を形成し、細胞間接着、上皮構造の維持、および生存に働く (a)。一方、非接着細胞において CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用が失われると、CADM1 は細胞内領域で caspase-7 による切断を受ける。その C 末端側断片により caspase-7 が活性化され、細胞死が誘導されることが示唆される。

実際に、可溶性リガンドと受容体との組み合わせで報告されている古典的 Dependence Receptors に加えて、Integrin の細胞 - 細胞外マトリックス (ECM) 間の接着をリガンドと受容体に見立てると、Integrin もまた相反する二つの働きを有する Dependence Receptor として働く可能性があることが報告されている⁵⁰。Integrin がコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンといった ECM のリガンドと結合している状態では、Integrin は細胞接着を制御することにより細胞の生存、増殖、浸潤に働く^{51,52}。一方、上皮細胞 - ECM 間接着が失われることによりリガンドと解離すると、Integrin は細胞に一般にアノイキスと呼ばれるアポトーシスを誘導する⁵³。これに対し、本研究において示された CADM1 独特の性質は、細胞 - ECM 間ではなく細胞 - 細胞間の相互作用がリガンドかつ受容体として機能するという点である。本研究で用いた浮遊・単細胞培養が細胞 - 細胞間接着を阻害するのみならず、細胞 - ECM 間接着も阻害する点は注目すべきであり、実際にアノイキスによって誘導される細胞死は、CADM1 が Dependence Receptor として働くことによって誘導される細胞死よりはるかに強力であると考えられる。なぜなら、5日間浮遊・単細胞培養を行った後のトリパンプルー排除法において、野生型 CADM1 を高発現していない MCF-7 細胞 (MCF-7/v, MCF-7/NAAN) においても約 60-70%の死細胞が検出された一方、通常培養では 5%以下の死細胞しか検出されなかったからである (図 9)。そして、MCF-7/CADM1 ではさらに約 25%の死細胞の増加が見られた。また、5日間浮遊・単細胞培養を行った後の SubG1 に含まれる細胞も、MCF-7/CADM1 では MCF-7/v, MCF-7/NAAN と比較して約 25%増加した。当然ながら、本実験では独立した 2 クローンを使用したため、caspase 認識配列に依存して細胞

死が誘導されたわけではなく、これら2クローンでは浮遊・単細胞状態で誘導される細胞死への感受性が期せずして高かった可能性も否定できない。しかしながら、MCF-7/CADM1 で MCF-7 / v, MCF-7 / NAAN と比較して約 25%の死細胞の増加が見られたことは非常に興味深い知見である。実際に浮遊・単細胞培養を始めた当初はアノイキスによって細胞死が誘導されるが、単細胞状態を維持せずその後の培養を行うことにより細胞が凝集し始めるとさらなる細胞死の誘導は起こらなくなるという実験結果も当研究室で示されている (図 6A)。以上より、細胞 - 細胞間接着の有無が細胞死誘導の新たな決定因子となり得る可能性が示唆される。がん細胞が転移過程の多くのステップを経て生存し、最終的に転移に成功する確率は極めて低いという事実を考慮すると、CADM1 が浮遊・単細胞状態で細胞死を誘導することにより約 25%の死細胞が増加することは、がん細胞の浸潤・転移を抑制することに対し多大な貢献をし得るものと予想される。

CADM1 が Dependence Receptor として、がん転移過程でアポトーシスを誘導するのがどのステップに当たるかも議論したい。一般にがんの転移は①上皮内がんの発生、②間質への浸潤、③血管内侵入、④血管内移動、⑤血管外遊出、⑥転移巣の形成などのステップから成る⁵⁴。これらのうち、CADM1 発現細胞においてアポトーシスが誘導される可能性があるステップは浮遊・単細胞となる状態、すなわち細胞 - ECM 間、および細胞 - 細胞間の接着が失われる可能性がある上記②~④と、複数のステップにわたる (図 15)。従って、CADM1 の Dependence Receptor としての機能はがん転移抑制を議論する際の必須概念ともなり得るかもしれない。これらを検討するためには、CADM1 を発現していない高転移性のヒト子宮頸がん細胞 HeLa やヒト乳がん細胞

MDA-MB-231 にレトロウイルスを用いて CADM1 安定高発現細胞株を樹立し、ヌードマウスの肺への転移能を評価する実験系が考えられる。

CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用が失われた際に細胞死が誘導されることを直接示すためには、図 6A のような凝集状態での浮遊培養実験に加え、後述するように CADM1 同士
の相互作用に重要な免疫グロブリンの Loop1 ドメインを欠損した CADM1 タンパク質を細胞に
発現させ、浮遊・単細胞培養で野生型 CADM1 同様に細胞死を誘導するかどうかを検討する方法
が考えられる。しかしながら当研究室の先行研究で、Loop1 欠損型 CADM1 は細胞膜に発現せ
ず、生成過程の途中でゴルジ体に集積してしまうことが示されており (未発表データ)、この方
法は選択できない。この問題を解決するには、CADM1 細胞内領域を NCAM など他の膜貫通タ
ンパク質の細胞内領域と入れ替えたキメラタンパク質を発現させ、浮遊・単細胞培養を試みると
いった手法などが考えられる。

本研究の図 12B において、MCF-7 / CADM1 #2 は MCF-7 / CADM1 #1 と比較して full-length
CADM1 を強く発現しており、それ故に Z-VAD-FMK 存在下でもなお多くの CADM1-CT が検出
されている。にも関わらず、図 12D においてその細胞死誘導能には大きな差が見られないが、
これには次のような理由が考えられる。一つは、MCF-7 / CADM1 #1 と MCF-7 / CADM1 #2 は異
なる細胞株由来であることから、その細胞死誘導能に差がある可能性である。二つ目は、細胞死
誘導に必要な CADM1-CT 量は、MCF-7 / CADM1 #1 の Z-VAD-FMK 非存在下で検出された量で
十分である可能性である。この二つ目の可能性は、MCF-7 / CADM1 #2 の Z-VAD-FMK 存在下で

なお多くの CADM1-CT 量が存在するにも関わらず、細胞死は抑制されているという結果と矛盾するようにも思われる。しかし実際は、Z-VAD-FMK の添加により caspase を介するシグナルが全て阻害されることにより、CADM1-CT の有無に関わらず細胞死誘導経路そのものが機能していないことが原因であると考えられる。そして三つ目として、MCF-7 / CADM1 #2 での Z-VAD-FMK 添加による細胞死誘導の抑制効果が MCF-7 / CADM1 #1 よりも小さい (図 12D) ことは、Z-VAD-FMK 存在下の MCF-7 / CADM1 #2 において、なお多くの CADM1-CT 量が検出されている結果を反映していると考えられる。

また図 12D, E で、MCF-7 / v, MCF-7 / CADM1 では Z-VAD-FMK 添加により細胞死が抑制される傾向が見られたが MCF-7 / NAAN ではこの傾向が見られなかった。これは、CADM1 を内在性に少量発現する MCF-7 細胞に CADM1-NAAN を発現させることにより、野生型 CADM1 に対して CADM1-NAAN がドミナント・ネガティブに働き、野生型 CADM1 によって誘導される細胞死が抑制された可能性が示唆される。実際に先行研究により、親株が CADM1 を高発現するヒト大腸がん細胞株である Caco-2 細胞に CADM1-NAAN をトランスフェクションしたところ、細胞死がむしろ抑制されたという結果が得られている (未発表データ)。CADM1 はホモ二量体を形成するため、二量体の片側が変異型となることにより細胞死誘導能に何かしらの支障を来すことが示唆される。

本研究では、CADM1-CT-C の細胞死誘導への重要性を論じるために、細胞内へのペプチド断片の直接導入を試みた。今回用いた Xfect™ Protein Transfection Reagent は既に他の論文での使用

実績がある試薬であり、免疫染色によるペプチド導入の確認が一般的に行われている⁵⁵。そこで本実験では蛍光顕微鏡での観察に加え、共焦点顕微鏡を用いた解析を行い、核内にペプチド断片が局在している状態を検出した。しかしながら、その染色像の確かさについてはまだ十分に論じられておらず、我々の結果はこのペプチド導入実験の確かさを完全に証明したものではない。また他の **Dependence Receptors** と比較した際に、今回のペプチド導入による細胞死誘導能がどの程度の強さのものであるかも示されていない。しかしながら、既に報告のある **Dependence Receptors** の断片を導入して細胞死誘導能を比較することは困難である。例えば、**UNC5H2** は **CADM1** と同じく **C** 末端側が細胞死誘導に重要であるが、図 3B で示したように、細胞死誘導能を発揮するためには **DAPK** などと複合体を形成することが必要である。従って、断片を単独で導入しても細胞死が誘導されないことが予想される。そこで、既に細胞死誘導能の報告のある図 16 に示す **Bim** ペプチドを導入し、本実験で用いた **CADM1-CT-C** ペプチド断片の細胞死誘導能と比較する実験が考えられる⁵⁶。 **Bim** はアポトーシス誘導に関与する **BCL-2** ファミリーのうち、アポトーシス促進因子であり、ペプチド配列に該当する **BH3** は **Bim** のエフェクタードメインである。この **Bim** ペプチドを使用した報告では、ペプチドを細胞内に導入するために **HIV-1** の **TAT** ペプチドを付加していたが、本実験ではペプチド導入試薬を用いるため **TAT** ペプチドは不要である。また **Bim** ペプチド本体は 21 アミノ酸残基であり、今回使用した **CADM1-CT** ペプチド断片とほぼ同じサイズである。しかしながら **Bim** はミトコンドリアに移動して細胞死誘導に関わる分子であるため、今回の **caspase-7** を介した細胞死誘導経路との直接的な比較はできないという問題点

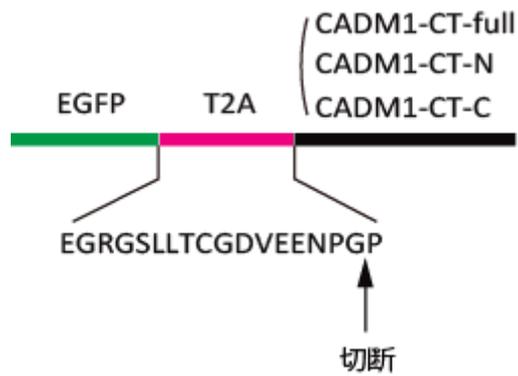


図 17. EGFP と CADM1-CT を T2A ペプチドで連結したタンパク質の模式図

T2A ペプチドはグリシン (G) とプロリン (P) との間で切れる自己切断活性を有するペプチドである。EGFP と CADM1-CT を T2A ペプチドで連結したタンパク質を細胞内で発現させると、EGFP + EGRGSLTTCGDVEENPG と P + CADM1-CT という 2 種類のタンパク質が発現する。

もある。Caspase 経路を介した細胞死誘導の評価にあたっては RGD ペプチドの使用が考えられる。RGD は、当初はインテグリンとそのリガンドとの結合を阻害することにより、細胞接着、浸潤、成長・分化を阻害するモチーフとして用いられ⁵⁷⁻⁵⁹、その後の研究では RGD ペプチドが細胞内で caspase-3 を活性化することにより細胞死を誘導することが報告されている。その報告でも本実験で使用した MCF-7 細胞を用いているが、caspase-3 発現を欠如する同細胞に対し、遺伝子導入により caspase-3 の発現を回復させた上で RGD ペプチドを取り込ませて細胞死誘導能を評価している⁶⁰。そのため、特殊なペプチド導入試薬を用いる本実験では、caspase-3 を発現させた上で RGD ペプチドを用いて検討することは困難であろう。なお、MCF-7 細胞でアポトーシス誘導を担う caspase-7 を活性化するようなペプチドはまだ報告されていない。

CADM1-CT-C の重要性を示すためにペプチド導入以外に考えられる手法としては、次に示す T2A ペプチドを利用したものが挙げられる。T2A ペプチドは口蹄疫ウイルス由来の自己切断活性を持つペプチドで、IRES のように 2 種類のタンパク質 (例：生物発光タンパク質と蛍光タンパク質) を発現させたい場合に用いられる⁶¹。IRES とは異なり、同じ mRNA で発現するため、同じプロモーターを使用して 2 種類のタンパク質を発現させることができる利点がある。実験系としては、図 17 に示すように、まず EGFP と CADM1-CT-full/-CT-N,/-CT-C の配列を T2A アミノ酸配列で連結した配列を有するベクターを構築する。ベクターが発現すると、T2A 配列中の最後のグリシンとプロリンの間で切断されるため、EGFP + EGRGSLLLTCGDVEENPG、P + CADM1-CT という 2 種類のタンパク質を発現させることができる。また 100%切断されるわけ

ではないので、抗 EGFP 抗体で全長の発現を確認することも可能である。従って、EGFP + EGRGSLLTCDGVEENPG の発現量を検出することにより、サイズが小さいため検出が難しい P +CADM1-CT の発現量を推定することができる。このベクターを MCF-7 細胞に導入し安定発現細胞株を樹立することにより、浮遊・単細胞培養下での細胞死誘導能を検討することが可能であろう。なお本研究において、CADM1-CT は浮遊・単細胞状態では細胞死を誘導したが、通常培養下では CADM1-CT が存在しても細胞死が誘導されないことから、安定発現細胞株の樹立自体は可能であると予想される。また、CADM1 細胞内領域の caspase 切断部位より C 末端側のアミノ酸に変異を入れることにより、野生型 CADM1 と比較して細胞死誘導能に差が出るかを検討する方法も考えられる。変異を入れる箇所としては、まず C 末端側の PDZ 結合領域を中心とした数アミノ酸が挙げられるだろう。理由としては、先行研究により PDZ 結合領域を欠損する CADM1 では腫瘍抑制能を欠くことが報告されているためである²⁷。さらに他の報告では、本研究で扱った CADM1-CT-C ペプチド断片領域を含む、より全長の長い CADM1 細胞内断片のアポトーシス誘導能に関する知見も 2014 年に得られており、肺気腫の患者の肺胞細胞ではこの CADM1 細胞内断片がミトコンドリアに集積することにより、アポトーシスが誘導されることが示されている⁶²。従って PDZ 結合領域に限らず、細胞内領域全域に渡って細胞死誘導能を有する責任領域を検討する必要性も示唆される。

細胞接着分子はがん抑制に働くタンパク質の一つであり、E-cadherin はその典型的な例として認識されている。E-cadherin はその細胞内領域で β -catenin などの結合パートナーと複合体を形成

して細胞接着に働くことにより、古典的ながん抑制に関与する。一方、E-cadherin の発現消失により β -catenin が E-cadherin 複合体から遊離すると、 β -catenin は核移行して転写因子 TCF/LEF と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化することにより細胞運動・浸潤を促進する⁵¹。このように、E-cadherin の発現消失は細胞接着の破綻のみならず、むしろがんの悪性度を増進する一連のステップの引き金となる。同様に、CADM1 は細胞骨格の再構成に関連する古典的ながん抑制タンパク質として細胞間接着に働くことに加え、本研究では CADM1 が上皮組織を維持するために、上皮細胞間の接着が剥離した際に caspase 経路を活性化することにより剥離した細胞にアポトーシスを誘導することが示された。逆に、がん細胞において CADM1 の発現が欠如すると、剥離した細胞はこの上皮の自己防衛システムから逃れて生存し、浸潤および転移へと進む。このように、上皮細胞の剥離とそれに引き続く CADM1 のような細胞接着分子の解離により、アポトーシスが誘導されることを本研究で提示したが、これらの知見はヒトのがんにおけるがん抑制機能に新たなカテゴリーを追加し得るものである。ここでは類似する機能を有するタンパクの総称として cell adhesion molecule (CAM) – type Dependence Receptors と呼びたい。これに関連して、CADM1-4 は免疫グロブリンスーパーファミリー cell adhesion molecule (IgCAM) のグループ内で独特なサブファミリーを形成しており、脊椎動物には CADM1 - 4 全てのオルソログが存在することから進化的にも保存されていることが報告されている⁶⁴。先行研究により、CADM2 は中枢神経系で細胞接着に関与することが報告されている一方⁶⁵、CADM2 の発現低下が見られるヒト前立腺がん細胞株およびヒト腎細胞がん細胞株において、その発現を回復させることに

より腫瘍抑制に働くことが報告されている^{66,67}。また CADM3 は脳に特異的に発現しシナプス形成に関与する一方⁶⁸、CADM3 の発現低下が見られるヒト神経膠腫細胞株にその発現を回復させることにより腫瘍抑制に働くことが報告されている⁶⁹。そして CADM4 は脳、腎、膀胱、前立腺などで発現し細胞接着に関わる一方、CADM4 の発現低下が見られるヒト前立腺がん細胞株およびヒト腎明細胞がん細胞株において、その発現を回復させることにより、やはり腫瘍抑制に働くことが報告されている^{70,71}。このように CADM ファミリーは中枢神経系で発現することによりその役割を担う一方、様々な組織で腫瘍抑制能を持つという性質を共有しているが、これは代表的な Dependence Receptors の性質とも一致する知見である。一方、CADM4 だけは CADM1-3 と比べて進化的にやや離れた分子であることが報告されており⁶⁴、今回着目した caspase-3/7 認識配列も CADM1-3 には全て細胞内領域に存在しているが、CADM4 だけには存在しない (表 5)。

これに一致する知見として、CADM1 の発現は乳がんにおける非常に良い予後のマーカーとなるが、CADM4 は有用なマーカーとならないことが当研究室で示されている¹⁹。従って今後、CADM4 を陰性コントロールとして、CADM2 と CADM3 にも CADM1 同様の細胞死誘導能があるかを検討することは大変興味深いことだと言えるだろう。以上から、CADM ファミリーの各分子はもちろん、他の細胞接着分子が CAM-type Dependence Receptors として働きうる可能性を持つことが示唆される。

最も根本的な質問の一つとして挙げられるのが、細胞間接着が剥離し CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用が失われた際に、CADM1 の細胞内領域がどのように caspase-7 により認

識され切断を受けるかというものである。代表的な Dependence Receptor である DCC や UNC5H などは、リガンド存在下ではホモ二量体を形成しているが、リガンドが外れることにより単量体となり、単量体となることにより細胞内領域が caspase による切断を受ける。従って、CADM1 の場合もトランス・ホモフィリック相互作用が存在していない状態では単量体となることにより、細胞内領域で caspase による切断を受けるようになると推測することができる。当研究室の以前の研究で、密集した状態の細胞に化学架橋剤を用いて CADM1 を検出すると、CADM1 は単量体、二量体、および多量体を形成することが示されている³。また CADM1 の発現は、隣接細胞が存在しない細胞辺縁ではなく、主に細胞 - 細胞間接着部位で見られることも報告されている。さらに RNAi を用いた実験において、細胞膜上での CADM1 発現量は、CADM1 (+) 細胞 - CADM1 (-) 細胞間の方が CADM1 (+) 細胞 - CADM1 (+) 細胞間と比べてはるかに低かった⁹。以上の知見は、隣接細胞が存在し、CADM1 がトランス・ホモフィリック相互作用している場合には細胞膜上に安定発現するが、トランス・ホモフィリック相互作用が失われると不安定になる可能性を支持するものである。他の Dependence Receptors が二量体を形成するように、CADM1 の場合も細胞間接着に関連した動的制御により、二量体または単量体の状態で存在するものと考えられる。以上より、CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用が失われることにより、CADM1 二量体も乖離し、単量体となると推測することができる。また当研究室の以前の報告では、CADM1 は細胞内領域の FERM 結合領域と PDZ 結合領域を介して、それぞれ 4.1B、MAGuKs と直接結合することが示されている。MAGuKs もまた HOOK ドメインを介して 4.1B と直接結合する。さら

に、4.1B と同じく FERM ドメインを有する merlin や ezrin が二量体を形成するように、4.1B も二量体を形成して CADM1 と結合しているものと予想される⁷²⁻⁷⁴。このように、CADM1 は単量体の状態では 4.1B や MAGuKs と複合体を形成せず、それ故に FERM 結合領域と PDZ 結合領域の間にある caspase-3/7 認識配列が露出することにより caspase による切断を受けるようになると考えられる。なお CADM1 の場合は、アノキスからの細胞死誘導シグナルが caspase-7 を活性化させ、トランス・ホモフィリック相互作用を失って単量体となった CADM1 を細胞内領域で切断することにより、CADM1 が Dependence Receptor として細胞死を誘導する際の開始点となる可能性が考えられる。今後の研究においては、蛍光標識を用いて CADM1 分子の単量体の挙動を検討することにより、細胞 - 細胞間の接着が剥離した際に caspase によって CADM1 が切断を受ける分子機構をさらに精査していくことが必要であろう。

また同様に分子機構に関して、本研究では CADM1 と caspase-7 との結合が示された。両者のモチーフを鑑みると結合は直接的ではなく、他の Dependence Receptors 同様、何らかのアダプタータンパク質を介するものと予想される。これまでに、caspase-7 は様々なタンパク質と結合することが報告されているが、その一つに p21-activated kinase 2 (PAK2) がある⁷⁵。PAK2 は PAK-interacting exchange factor β (β PIX) と複合体形成することが示されているが、 β PIX は CADM1 と同じく PDZ 結合領域を持つ⁷⁶。これまでに β PIX - PAK2 が複合体形成するのは接着結合部であり、この複合体はアポトーシス誘導を正負に調節することが報告されており、これらは CADM1 が細胞接着分子である点、および Dependence Receptors がアポトーシスを正負に制御する点と一

致する知見である。今後、これらの caspase-7 結合パートナーを中心とした更なる分子機構の解析を進めていきたいと考えている。

一方、がん抑制遺伝子として同定された *CADM1* であるが、ATL および SCLC では疾患特異的に過剰発現していることが報告されている^{25, 26}。ATL, SCLC 細胞は浮遊状態で増殖する 경우가多く、ATL, SCLC 細胞でも *CADM1* が Dependence Receptor と働くのであれば矛盾が生じるが、これに対して次のような説明が考えられる。まず第一に、ATL における *CADM1* は、Rac 特異的グアニンヌクレオチド交換因子である T-lymphoma invasion and metastasis 1 (Tiam1) と複合体を形成し、Rac の活性化を介して葉状仮足を形成することが示されており⁷⁷、ATL と上皮では *CADM1* の細胞内結合タンパク質、並びに機能が異なる可能性がある。第二に、SCLC に発現する *CADM1* は上皮で発現するエクソン 8 を持つ 8 型に加え、エクソン 8 と 9 を持つ 8/9 型が発現することから、機能が異なる可能性が示唆される。また *CADM1* の免疫グロブリン様ループ上に存在する *N*-型糖鎖の修飾様式も SCLC と上皮では大きく異なることが当研究室で報告されており、同じ 8 型 *CADM1* を発現する上皮細胞、ATL 細胞間でも大きく異なることが示されている (未発表データ)。従って、*CADM1* の *N*-型糖鎖様式は細胞の表現型を修飾する可能性があり、当研究室で予備的結果も得られている。以上から、ATL および SCLC で発現する *CADM1* は Dependence Receptor として機能しなくても矛盾しないと考えられる。

本研究ではまた、*CADM1*-CT-C ペプチド断片が細胞死を誘導することを示した。この知見から、*CADM1* 細胞内断片は非常に有望ながんの治療標的となり得る可能性がある。治療標的とい

う観点で見ると、CADM1 の発現を欠如するがん細胞に対し、CADM1 の発現を回復させることが生理学的には最適なアプローチである。しかしながら、CADM1 全長の 442 アミノ酸を細胞に発現させるためには、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法などのように、高度に複雑な導入系を選択してやる必要がある。これに対し、CADM1-CT-C ペプチド断片の 23 アミノ酸が細胞死誘導能を持つことは、治療面でも有望な所見であると言える。CADM1-CT-C ペプチド断片の親株 MCF-7 細胞への導入による細胞死誘導は浮遊・単細胞培養下でのみ見られた現象であり、通常培養では見られなかったことも注目すべき点である。なぜなら、CADM1-CT-C ペプチド断片は剥離したがん細胞には細胞死を誘導するが、ECM に接着している正常上皮細胞には影響がないことが示唆されるからである。これに関連し、MCF-7/CADM1 の CADM-CT は浮遊・単細胞培養下のみならず通常培養下でもかなりの量が検出されたことも注目すべき点である。通常培養下でもかなりの量の CADM1-CT が検出されているにも関わらず、cleaved caspase-7 の発現、および細胞死誘導は浮遊・単細胞培養下でのみ見られた。以上の結果から、CADM1-CT の存在は細胞への細胞死誘導に必要であるが、それだけでは十分ではないことが示唆される。また、CADM1-CT-C ペプチド断片が剥離したがん細胞に対し選択的に細胞死を誘導する性質を有するならば、がん治療における有望な標的となり得る。今後の研究では、浮遊・単細胞状態の上皮細胞において caspases シグナルを増幅させるさらなる因子を同定することが必要となる。

実際に Dependence Receptors の治療への応用は、ここ数年で精力的に取り組まれている分野である^{28,29}。代表的な Dependence Receptor である DCC と UNC5 は、治療においても最も研究が進

められている。ヒトのがん細胞を Doxorubicin、5-Fluorouracil、Paclitaxel、cisplatin など処理すると、DCC、UNC5 の発現上昇と共に、それらのリガンドである netrin-1 の発現も上昇したことから、現在、netrin-1 をトラップする TRAP-netrin^{DCC} および TRAP-netrin^{UNC5A} という、DCC と UNC5A の一部分から成るリコンビナントタンパク質を用いた治療法が研究されており、既に前臨床段階の *in vitro*、*in vivo* における腫瘍抑制能は論文で報告されている⁷⁸。また同じく Dependence Receptors の一員である Plexin D1 もそのリガンドである Semaphorin 3E の存在下ではアポトーシスを抑制するが、Semaphorin 3E の発現レベルがヒト乳がんにおいて転移能の亢進と共に上昇することが示された⁷⁹。そこで、Plexin D1 が Semaphorin 3E と結合する部分から成る可溶性リコンビナントタンパク質を作製し、*in vivo* で腫瘍抑制能を検討したところ、実際にその効果が確認された。このように、Dependence Receptors の前臨床における治療効果は既に確立されつつある。CADM1 の Dependence Receptor としての機能を治療に結び付けて考えるにあたって、免疫グロブリン様ループのうち Loop1 を介してトランス・ホモフィリック相互作用を形成するという知見を参照したい^{11,80}。すなわち、CADM1 - Loop1 特異抗体を作製すれば、CADM1 同士の相互作用を抑制することができるはずである (図 18)。また、CADM1 の発現は主に進行がん欠如することから²³、その前段階で腫瘍細胞を除去するために CADM1 の Dependence Receptor としての機能が必要であると考え、CADM1 - Loop1 特異抗体によりがん細胞特異的にアポトーシスを誘導することが可能であると想定される。しかしながら当研究室の先行研究で、CADM1-EC-Fc の代わりに抗 CADM1 - Loop1 ドメインのマスキング抗体である 9D2 (MBL 社)

を添加し、浮遊・単細胞培養を行った後に死細胞を測定したところ、9D2 の添加によっても細胞死が抑制される傾向が得られた (未発表データ)。すなわち、CADM1 - Loop1 特異抗体も相互作用阻害というよりも、むしろ接着を模倣してしまう可能性も考えられる点は留意すべきポイントである。

古典的 Dependence Receptors の多くでは上皮の安全装置として機能するのみならず、神経細胞の分化・調節に関与することが示されている。例えば、DCC はその可溶性リガンドである netrin-1 と結合することにより軸索誘導に関与する一方、リガンドと解離すると細胞にアポトーシスを誘導する。CADM1 も同様に、CADM1 細胞外断片が上顎神経節の軸索誘導に働くことが当研究室で示されている^{42,81}。今後は CADM1 の細胞外断片を同定し、それらの生理学的意義を明らかにすることが必要である。

本研究内容をまとめると、CADM1 のトランス・ホモフィリック相互作用がリガンドかつ受容体として機能すると仮定すると、CADM1 は新しいタイプの Dependence receptor として働くことを示した。また、この CAM-type Dependence Receptors は、上皮細胞膜に発現するがん抑制タンパク質という新たなカテゴリーを提示し得るものである。

表 5. CADM ファミリー (CADM1, CADM2, CADM3, CADM4) の細胞内領域アミノ酸配列

分子名	アミノ酸配列	残基数
CADM1	RYFARHKGTYFTHEAKGADDAADADTAIIINAEGGQNNSEEKKEYFI	46
CADM2	RYLARHKGTYLTNEAKGAEDAPDADTAIIINAEGSQVNAEEKKEYFI	46
CADM3	HYLIRHKGTYLTNEAKGSDDAPDADTAIIINAEGGQSGGDDKKEYFI	46
CADM4	CSVQRQKGSYLTNEASGLDEQGEAREAFNLNGSDGHKRKEEFFI	42

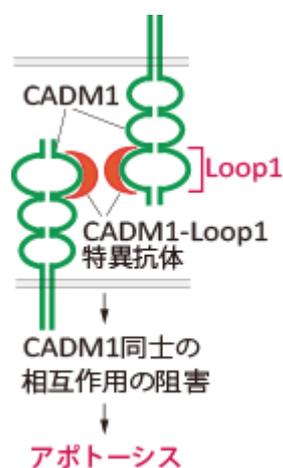


図 18. CADM1 - Loop1 特異抗体によりアポトーシスを誘導できる可能性がある

CADM1-EC-Fc のように、CADM1 細胞外領域の全域を含むリコンビナントタンパク質では、細胞間接着が模倣され得ることによりアポトーシスが抑制されるが、CADM1 同士の接着に重要な Loop1 ドメインのみを特異的に阻害する抗体を開発することにより、アポトーシスを誘導できる可能性がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野の村上善則 教授に深謝申し上げます。また、研究を基礎からご指導下さった櫻井美佳 助教 (現・客員研究員) に心より感謝を表します。*In vitro* での CADM1 切断実験および適切な助言を賜りました、Université de Lyon, Centre de recherche en cancérologie de Lyon. の Patrick Mehlen 博士、Céline Delloye-Bourgeois 博士、Servane Tauszig-Delamasure 博士に感謝申し上げます。本研究の遂行に際し適切な助言を賜りました坂本毅治 助教、伊東剛 助教をはじめ、日々の研究生活において様々な面でご支援いただきました東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野の松原大祐 講師、坪井裕見 博士、斉藤杏里 博士、増田智子 氏、市原博美 氏、河本貴子 氏、岩井美和子 博士、池田有紀 博士、中岡寛樹 氏、許淑真 氏、熊谷友紀 氏、平郁 氏、明石健 氏、金谷淳志 氏、土屋武弘 氏、佐藤彩花 氏、顔暁珮 氏、室井正謙 氏、野口美咲 氏、牧谷佳苗 氏、笠井優 氏、田淵拓也 氏、三隅匡也 氏に感謝いたします。

参考文献

[1] 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. (2001) TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 27:427-430.

[2] Murakami Y. (2002) Functional cloning of a tumor suppressor gene, TSLC1, in human non-small cell lung cancer, *Oncogene.* 21:6936-6948.

[3] Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, Murakami Y. (2002) The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 277:31014-31019.

[4] Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. (2002) Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res.* 62:5129-5133.

[5] Tran YK, Böglér O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, Newsham IF. (1999) A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res.* 59:35-43.

- [6] Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, Südhof TC. (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*. 297:1525-1531.
- [7] Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, Satoh K, Takeuchi M, Imai T, Monden M, Takai Y. (2003) 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.
- [8] Fukuhara H, Masuda M, Yageta M, Fukami T, Kuramochi M, Maruyama T, Kitamura T, Murakami Y. (2003) Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of *Drosophila* tumor suppressor Dlg. *Oncogene*. 22:6160-6165.
- [9] Sakurai-Yageta M, Masuda M, Tsuboi Y, Ito A, Murakami Y. (2009) Tumor suppressor CADM1 is involved in epithelial cell structure. *Biochem Biophys Res Commun*. 390:977-982.
- [10] Murakami S, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Murakami Y. (2014) *Trans*-Homophilic Interaction of CADM1 Activates PI3K by Forming a Complex with MAGuK-Family Proteins MPP3 and Dlg. *PLoS One*. 9: e82894.

[11] Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, Arase H, Saito T. (2005) Heterotypic interaction of CRTAM with Nectin2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int Immunol*. 17:1227-1237.

[12] Galibert L, Diemer GS, Liu Z, Johnson RS, Smith JL, Walzer T, Comeau MR, Rauch CT, Wolfson MF, Sorensen RA, Van der Vuurst de Vries AR, Branstetter DG, Koelling RM, Scholler J, Fanslow WC, Baum PR, Derry JM, Yan W. (2005) Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J Biol Chem*. 280:21955-21964.

[13] Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M. (2005) The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood*. 106:779-786.

[14] Wakayama T, Ohashi K, Mizuno K, Iseki S. (2001) Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells. *Mol reprod Dev*. 60:158-164.

[15] Ito A, Jippo T, Wakayama T, Morii E, Koma Y, Onda H, Nojima H, Iseki S, Kitamura Y. (2003)

SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITF. *Blood*. 101:2601-2608.

[16] Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Williams YN, Maruyama T, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y. (2005) Promoter methylation of DAL-1/4.1B predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 11:2954-2961.

[17] Heller G, Fong KM, Girard L, Seidl S, End-Pfützenreuter A, Lang G, Gazdar AF, Minna JD, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. (2006) Expression and methylation pattern of TSLC1 cascade genes in lung carcinomas. *Oncogene*. 25:959-968.

[18] Heller G, Geradts J, Ziegler B, Newsham I, Filipits M, Markis-Ritzinger EM, Kandioler D, Berger W, Stiglbauer W, Depisch D, Pirker R, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. (2007) Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 103:283-291.

[19] Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, Murakami Y. (2012) Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*. 19:242-252.

- [20] Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, Snijders PJ. (2004) TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 96, 294-305.
- [21] Li J, Zhang Z, Bidder M, Funk MC, Nguyen L, Goodfellow PJ, Rader JS. (2005) IGSF4 promoter methylation and expression silencing in human cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 96, 150-158.
- [22] Honda T, Tamura G, Waki T, Jin Z, Sato K, Motoyama T, Kawata S, Kimura W, Nishizuka S, Murakami Y. (2002) Hypermethylation of the TSLC1 gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res.* 93:857-860.
- [23] K. Uchino, A. Ito, T. Wakayama, Y. Koma, T. Okada, C. Ohbayashi, S. Iseki, Y. Kitamura, N. Tsubota, Y. Okita, M. Okada, (2003) Clinical implication and prognostic significance of the tumor suppressor TSLC1 gene detected in adenocarcinoma of the lung, *Cancer.* 98:1002-1007.
- [24] Murakami Y. (2005) Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci.* 96:543-552.

[25] Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y, Tsubouchi H, Morishita K. (2005) Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood*. 105:1204-1213.

[26] Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Maruyama T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, Murakami Y. (2012) Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 103:1051-1057.

[27] Mao X, Seidlitz E, Ghosh K, Murakami Y, Ghosh HP. (2003) The cytoplasmic domain is critical to the tumor suppressor activity of TSLC1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 63, 7979-7985.

[28] Goldschneider D, Mehlen P. (2010) Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene*. 29, 1865-1882.

[29] Mehlen P, Bredesen DE. (2011) Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal* 4(157).

[30] Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE. (1993) Induction of

apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science*. 261:345-348.

[31] Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 294:1945-1948.

[32] Yaar M, Zhai S, Fine RE, Eisenhauer PB, Arble BL, Stewart KB, Gilchrist BA. (2002) Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J Biol Chem*. 277:7720-7725.

[33] Della-Bianca V, Rossi F, Armato U, Dal-Pra I, Costantini C, Perini G, Politi V, Della Valle G. Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). (2001) *J Biol Chem*. 276:38929-38933.

[34] Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*. 247:49-56.

[35] Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M.

(1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system.

Cell. 87, 1001-1014.

[36] Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature.* 395, 801-804.

[37] Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY, Mehlen P. (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature.* 431, 80-4.

[38] Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, Mehlen P. (2001) The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 3416-3421.

[39] Liu J, Yao F, Wu R, Morgan M, Thorburn A, Finley RL Jr, Chen YQ. (2002) Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J Biol Chem.* 277:26281-5.

[40] Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* 20, 2715-2722.

[41] Williams ME, Strickland P, Watanabe K, Hinck L. (2003) UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J Biol Chem.* 278, 17483-17490.

[42] Llambi F, Lourenço FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G, Kimchi A, Mehlen P. (2005) The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J.* 24, 1192-1201.

[43] Bernet A, Mehlen P. (2007) Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. *Bull Cancer.* 94:E12-7.

[44] Nicholson DW, Thornberry NA. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 22, 299-306.

[45] Takizawa T, Tatematsu C, Watanabe K, Kato K, Nakanishi Y. (2004) Cleavage of calnexin caused by apoptotic stimuli: implication for the regulation of apoptosis. *J Biochem.* 136, 399-405.

[46] T. Ito, Y. Williams-Nate, M. Iwai, Y. Tsuboi, M. Hagiyaama, A. Ito, M. Sakurai-Yageta, Y. Murakami. (2011) Transcriptional regulation of the CADM1 gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells, *Genes Cells.* 16 791-802.

[47] Ito A, Okada M, Uchino K, Wakayama T, Koma Y, Iseki S, Tsubota N, Okita Y, Kitamura Y. (2003)

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.

[48] Hashimoto T, Yamauchi L, Hunter T, Kikkawa U, Kamada S. (2008) Possible involvement of caspase-

7 in cell cycle progression at mitosis. *Genes Cells.* 13, 609-621.

[49] Liang Y, Yan C, Schor NF. (2001) Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene.* 20, 6570-6578.

[50] Stupack DG. (2005) Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Cell Death Differ.*

12:1021-1030.

[51] Hynes RO. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69, 11-25.

[52] Giancotti FG, Ruoslahti E. (1999) Integrin signaling. *Science.* 285, 1028-1032.

[53] Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA. (2001) Apoptosis of adherent

cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol.* 155, 459-470.

[54] Valastyan S, Weinberg RA. (2011) Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 147:275-292.

[55] Motizuki M, Isogaya K, Miyake K, Ikushima H, Kubota T, Miyazono K, Saitoh M, Miyazawa K. (2013) Oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) is a Smad cofactor involved in cell motility induced by transforming growth factor- β . *J Biol Chem.* 288:18911-18922

[56] Kashiwagi H, McDunn JE, Goedegebuure PS, Gaffney MC, Chang K, Trinkaus K, Piwnica-Worms D, Hotchkiss RS, Hawkins WG. (2007) TAT-Bim induces extensive apoptosis in cancer cells. *Ann Surg Oncol.* 14:1763-1771

[57] Ruoslahti E. (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:697-715.

[58] Meredith JE Jr, Schwartz MA. (1997) Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol.* 7:146-150.

- [59] Werb Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*. 91:439-442.
- [60] Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, Parsonage G, Threlfall K, Scheel-Toellner D, Simmons DL, Akbar AN, Lord JM, Salmon M. (1999) RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature*. 397:534-539.
- [61] Ryan MD, King AM, Thomas GP. (1991) Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol*. 72:2727-32.
- [62] Mimae T, Hagiyaama M, Inoue T, Yoneshige A, Kato T, Okada M, Murakami Y, Ito A. (2014) Increased ectodomain shedding of lung epithelial cell adhesion molecule 1 as a cause of increased alveolar cell apoptosis in emphysema. *Thorax*. 69:223-231.
- [63] Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. (2009) E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 28:151-166.
- [64] Biederer T. (2006) Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics*. 87:139-50.

[65] Pellissier F, Gerber A, Bauer C, Ballivet M, Ossipow V. (2007) The adhesion molecule Nectin-3/SynCAM-2 localizes to myelinated axons, binds to oligodendrocytes and promotes cell adhesion. *BMC Neurosci.* 8:90.

[66] Chang G, Xu S, Dhir R, Chandran U, O'Keefe DS, Greenberg NM, Gingrich JR. (2010) Hypoexpression and epigenetic regulation of candidate tumor suppressor gene CADM-2 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 16:5390-5401.

[67] He W, Li X, Xu S, Ai J, Gong Y, Gregg JL, Guan R, Qiu W, Xin D, Gingrich JR, Guo Y, Chang G. (2013) Aberrant methylation and loss of CADM2 tumor suppressor expression is associated with human renal cell carcinoma tumor progression. *Biochem Biophys Res Commun.* 435:526-532

[68] Kakunaga S, Ikeda W, Itoh S, Deguchi-Tawarada M, Ohtsuka T, Mizoguchi A, Takai Y. (2005) Nectin-like molecule-1/TSL1/SynCAM3: a neural tissue-specific immunoglobulin-like cell-cell adhesion molecule localizing at non-junctional contact sites of presynaptic nerve terminals, axons and glia cell processes. *J Cell Sci.* 118:1267-1277.

[69] Gao J, Chen T, Liu J, Liu W, Hu G, Guo X, Yin B, Gong Y, Zhao J, Qiang B, Yuan J, Peng X. (2009)

Loss of NECL1, a novel tumor suppressor, can be restored in glioma by HDAC inhibitor-Trichostatin A through Sp1 binding site. *Glia*. 57:989-999

[70] Williams YN, Masuda M, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Shibuya M, Murakami Y. (2006) Cell adhesion and prostate tumor-suppressor activity of TSL2/IGSF4C, an immunoglobulin superfamily molecule homologous to TSLC1/IGSF4. *Oncogene*. 25:1446-1453.

[71] Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y. (2012) Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*. 130:1329-1337

[72] Nguyen R, Reczek D, Bretscher A. (2001) Hierarchy of merlin and ezrin N- and C-terminal domain interactions in homo- and heterotypic associations and their relationship to binding of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP. *J Biol Chem*. 276:7621-7629.

[73] Stokowski RP, Cox DR. (2000) Functional analysis of the neurofibromatosis type 2 protein by means of disease-causing point mutations. *Am J Hum Genet*. 66:873-891.

[74] Yogesha SD, Sharff AJ, Giovannini M, Bricogne G, Izard T. (2011) Unfurling of the band 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain of the merlin tumor suppressor. *Protein Sci.* 20:2113-2120.

[75] Li X, Wen W, Liu K, Zhu F, Malakhova M, Peng C, Li T, Kim HG, Ma W, Cho YY, Bode AM, Dong Z, Dong Z. (2011) Phosphorylation of caspase-7 by p21-activated protein kinase (PAK) 2 inhibits chemotherapeutic drug-induced apoptosis of breast cancer cell lines. *J Biol Chem.* 286:22291-22299.

[76] Frank SR, Bell JH, Frödin M, Hansen SH. (2012) A β PIX-PAK2 complex confers protection against Scrib-dependent and cadherin-mediated apoptosis. *Curr Biol.* 22:1747-1754.

[77] Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Ito A, Hayashi T, Tsukasaki K, Kamihira S, Yamaoka S, Hoshino H, Yoshida T, Watanabe T, Stanbridge EJ, Murakami Y. (2010) CADM1 interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I-transformed cells and adult T-cell leukemia cells. *J Biol Chem.* 285:15511-22.

[78] Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, Cleysac E, Treilleux I, Klein C, Niederfellner G, Cassier PA, Bernet A, Mehlen P. (2013) Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med.* 5:1821-1834.

[79] Luchino J, Hocine M, Amoureux MC, Gibert B, Bernet A, Royet A, Treilleux I, Lécine P, Borg JP, Mehlen P, Chauvet S, Mann F. (2013) Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers. *Cancer Cell*. 24:673-685.

[80] Miyahara M, Nakanishi H, Takahashi K, Satoh-Horikawa K, Tachibana K, Takai Y. (2000) Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction. *J Biol Chem*. 275, 613-618

[81] Hagiyama M, Ichiyangi N, Kimura KB, Murakami Y, Ito A. (2009) Expression of a soluble isoform of cell adhesion molecule 1 in the brain and its involvement in directional neurite outgrowth. *Am J Pathol*. 174:2278-2289