

論文審査の結果の要旨

氏名 小粥 浩之

CADM1 は非小細胞肺癌 (NSCLC) のがん抑制遺伝子として当研究室で同定された、免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子 (IgCAM) である。正常上皮では隣接する細胞間の *CADM1* 同士の相互作用により細胞接着に関与する。一方、接着を失ったがん細胞では *CADM1* の発現欠如が見られる。これに対し、肺癌細胞 A549 に *CADM1* の発現を回復し、剥離させた状態でマウスの脾臓に注入すると、肝臓への実験的転移が抑制された。そこで本研究では、相互作用を失った *CADM1* が細胞死を誘導する可能性を検討し、そのメカニズムを解明することを目的として解析を行った。本論文では、メカニズム解明にあたり **Dependence Receptor** という概念に着目した。**Dependence Receptor** は、リガンド存在下では細胞の分化・生存に働くが、リガンド非存在下では 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誘導を引き起こす受容体である。*CADM1* の相互作用が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細胞死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。*CADM1* は細胞内領域に caspase 認識配列 (DAAD) を持つ。まず、エストロゲン感受性で、*CADM1* を内在性に少量発現するヒト乳がん由来細胞株である 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。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。以下、*CADM1* の caspase による切断、および細胞のアポトーシス誘導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、およびフローサイトメトリーで DNA 含量を測定し SubG1 に含まれる細胞数を測定した。その結果、通常培養ではいずれのアッセイでもクローン間での死細胞の割合に差は見られなかった。対照的に浮遊・単細胞培養においては、MCF-7 / *CADM1* 細胞株で MCF-7 / v 細胞株に比べて死細胞が有意に増加したが、その増加は MCF-7 / NAAN 変異細胞株では見られなかった。以上の結果から細胞間接着の剥離により、*CADM1* は caspase 認識配列依存的にアポトーシスを誘導することが示された。次に、細胞外領域における *CADM1* 同士の相互作用が細胞死誘導に与える影響について検討した。この目的のために、*CADM1* 細胞外領域から成る組み換えタンパク質 (*CADM1*-EC-Fc) を作製し、MCF-7 / *CADM1* 細胞株の浮遊・単細胞培養中に添加して培養した。まず、細胞表面の *CADM1* と *CADM1*-EC-Fc の相互作用を、抗 Fc 抗体を

用いた免疫染色法で検出したところ、コントロール IgG 添加群と比較して、CADM1-EC-Fc を添加した場合のみ相互作用を確認することができた。また 5 日間の培養後に生存率を測定したところ、CADM1-EC-Fc の添加により、コントロール IgG と比較して生存率が有意に増加した。以上の結果から、CADM1-EC-Fc の添加により、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。続いて、caspase-7 による CADM1 の切断とアポトーシス誘導との関連性を検討するため、全 caspase 阻害剤 Z-VAD-FMK を添加して浮遊・単細胞培養を行い、細胞回収後に CADM1 の C 末端断片 (CADM1-CT) と cleaved caspase-7 の検出を行うと同時に、トリパンブルー排除法、およびフローサイトメトリーで DNA 含量を測定し SubG1 に含まれる細胞数を測定した。その結果、MCF-7 / CADM1 細胞株では CADM1-CT が多く検出され、また CADM1-CT 量は Z-VAD-FMK 添加により有意に減少した。このとき、cleaved caspase-7 も Z-VAD-FMK 添加により減少した。同時に測定した死細胞の割合も、CADM1-CT が多く検出された MCF-7 / CADM1 細胞株では多く見られ、また Z-VAD-FMK 添加により、MCF-7 / CADM1 細胞株では死細胞の割合が有意に減少したが、MCF-7 / NAAN 細胞株では減少が見られなかった。さらに、MCF-7 / CADM1 細胞株に siRNA を用いて caspase-7 遺伝子の発現を抑制したところ、Z-VAD-FMK 添加時同様、CADM1-CT 量の減少が見られた。以上より、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ことが示された。さらに、CADM1-CT と細胞死誘導との関連性を検討するために、CADM1 細胞内領域のうち、caspase 切断サイトで二分される N 末端側、C 末端側のペプチド断片を合成し、浮遊・単細胞状態で親株の MCF-7 細胞内に導入した。ペプチド断片導入後、24 時間の浮遊・単細胞培養の後、トリパンブルー排除法により死細胞を測定した。その結果、C 末端側ペプチド断片の導入により、DMSO と比較して死細胞の割合が有意に増加したが、N 末端側ペプチド断片の導入では死細胞の増加は見られなかった。以上の結果から、浮遊・単細胞培養中での細胞死誘導には CADM1 細胞内領域のうち、caspase 切断サイトより C 末端側が重要であることが示された。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、次のようなモデルを提示した。細胞 - ECM 間、および CADM1 を介した細胞 - 細胞間接着が両方とも失われると、CADM1 の細胞内領域が caspase-7 による切断を受ける。その C 末端断片により caspase-7 が活性化され、細胞死を誘導することが示唆される。またこの機構により、CADM1 はがん細胞の転移を抑制することが示唆される。

なお、本論文は、櫻井美佳博士、村上善則博士との共同研究であるが、論文執筆者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文執筆者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

